UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1934-1935 N° 4

RECHERCHES ANALYTIQUES SUR L'ARGININE ET L'HISTIDINE

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

présentée et soutenue le 19 décembre 1934

PAR

Jacques BUSSIT

Pharmacien

Ex-Interne Lauréat des Hôpitaux de Paris

JURY
MM. R. FABRE, *Président.*
H. HÉRISSEY, *Professeur.*
P. FLEURY, *Agrégé.*

PARIS

HERMANN & Cie, ÉDITEURS

6, Rue de la Sorbonne, 6

1934

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551410_0064

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1934-1935 N° 4

RECHERCHES ANALYTIQUES SUR L'ARGININE ET L'HISTIDINE

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

présentée et soutenue le 19 décembre 1934

PAR

Jacques BUSSIT

Pharmacien

Ex-Interne Lauréat des Hôpitaux de Paris

JURY { MM. R. FABRE, *Président*.
H. HÉRISSEY, *Professeur*.
P. FLEURY, *Agrégé*.

PARIS

HERMANN & Cie, ÉDITEURS

6, Rue de la Sorbonne, 6

1934

Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

ADMINISTRATION

MM. GUÉRIN, *Doyen*, O. ✻, ✪ I.
P. LEBEAU, *Assesseur*, O. ✻, ✪ I.
P. DESPORT, *Secrétaire*, ✻, ✪ I.

PROFESSEURS

MM. GUÉRIN, O ✻, ✪ I.	Botanique générale.
PERROT, O. ✻, ✪ I.	Histoire naturelle des Médicaments.
COUTIÈRE, O. ✻, ✪ I.	Zoologie.
LEBEAU, O. ✻, ✪ I.	Pharmacie chimique.
BOUGAULT, ✻, ✪ I.	Chimie analytique.
GORIS, O. ✻, ✪ I.	Pharmacie galénique.
TASSILLY, O. ✻, ✪ I.	Physique.
DAMIENS, ✻, ✪ I.	Chimie minérale.
HÉRISSEY, O. ✻, ✪ I.	Chimie biologique.
SOMMELET, ✻, ✪ I.	Chimie organique.
LUTZ, O. ✻, ✪ I.	Cryptogamie et Microbiologie.
FABRE, ✻, ✪ I.	Toxicologie.
LAUNOY, O. ✻, ✪ I.	Professeur sans chaire.

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. ✻, ✪ I.
Professeurs honoraires : MM. BÉHAL, G. O. ✻, ✪ I., et DELÉPINE, O. ✻, ✪ I., membres de l'Institut, et GUERBET, ✻, ✪ I.

CHARGÉS DE COURS

MM. MARC HONNORAT, ✻, ✪ I.	Législation et Déontologie pharmaceutiques.
LAUNOY, O. ✻, ✪ I.	Pharmacodynamie.
DELABY, ✻, ✪ I.	Hydrologie et Hygiène.
PICON, ✪ I.	Minéralogie.
BACH, ✪ I.	Microbiologie.
FLEURY, ✪ I.	Chimie organique.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. DELABY, ✻, ✪ A.
PICON, ✪ I.

MM. MASCRÉ, ✪ I.
FLEURY, ✪ I
BACH, ✪ I.

MM. BEDEL, ✪ I.
RÉGNIER, ✪ I.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. BEDEL, ✪ I., agrégé, chargé des T. P. de 1re année	Chimie générale.
FLEURY, ✪ I. et RÉGNIER, ✪ I. : *agrégés*, chargés des travaux de	Chimie analytique.
SOUÈGES, ✪ I.	Micrographie.
LEROUX, ✪ I.	Physique.
DEVAL, ✻, ✪ I.	Microbiologie.

DELABY, ✻, ✪ I., PICON, ✪ I. et MASCRÉ, ✪ I. : *agrégés*, chargés des Travaux généraux de 4e année

Bibliothécaire en Chef : M. BERNARD, ✪ I.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A MES PARENTS

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

M. LE PROFESSEUR R. FABRE

Professeur de Toxicologie à la Faculté de Pharmacie
Pharmacien du Groupe Hospitalier Necker Enfans-Malades
Chevalier de la Légion d'honneur

Hommage de gratitude.

A M. le Professeur H. HÉRISSEY

Professeur de Chimie biologique à la Faculté de Pharmacie
Pharmacien de l'Hôpital Saint-Antoine
Officier de la Légion d'honneur

Hommage de profond respect.

A M. le Professeur E. AUBEL

Chef du Service de Biochimie
Institut de Biologie physico-chimique

Hommage de reconnaissance.

RECHERCHES ANALYTIQUES
SUR L'ARGININE ET L'HISTIDINE

INTRODUCTION

L'extrême importance des acides diaminés ou bases hexoniques, — arginine, histidine, lysine — n'est plus à démontrer.

La chimie biologique commence à classer les différents protéides d'après leur teneur en acides diaminés : c'est ainsi que Thomas [1] distingue les protamines qui contiennent au moins 80 % de bases hexoniques, les histones qui n'en contiennent que 30 % et enfin un groupe hétérogène qui n'a pour caractère commun qu'une teneur de 10-15 % en bases hexoniques et qui se subdivise d'après sa composition en acides monoaminés, et que Roche [2] établit une classification des globines. La physiologie étudie d'une part le rôle joué par les acides diaminés libérés à l'intérieur de l'organisme — l'histidine et l'arginine paraissent indispensables à la croissance — d'autre part, l'évolution de la teneur en acides diaminés des protéides d'un organisme vivant, animal ou végétal, au cours de son développement, en particulier au moment de la reproduction et de la naissance.

La pharmacie demandera aux acides diaminés une classification et une définition rationnelles des protéides et de leurs dérivés qu'elle utilise (peptones), et l'analyse des différents protéides des sérums employés en thérapeutique montrera peut-être des différences fondamentales au point de vue teneur en acides diaminés, entre les fractions douées de pouvoirs physiologiques très dissemblables.

Les études entreprises jusqu'ici ont eu principalement pour but de faire un recensement général des protéides au point de vue de leur teneur en acides diaminés. L'examen de nombreux travaux effectués jusqu'ici montre la vanité des efforts qui ont été faits dans le but de trouver des méthodes de dosage sensibles et fidèles. Pres-

que tous les travaux commencent par une critique des méthodes analytiques employées par les prédécesseurs et aboutissent à l'élaboration de nouvelles techniques qui subiront le sort des précédentes. On pourrait penser que la médiocrité des résultats obtenus actuellement tenait au fait que l'on avait abordé le problème par le côté le plus compliqué : à savoir la séparation dans les hydrolysats de matières protéiques. On pouvait espérer en prenant au contraire les cas les plus simples, c'est-à-dire l'étude des aminoacides en solutions pures, puis de mélanges de plus en plus complexes, apporter des bases pour une solution plus satisfaisante. C'est ce qui nous a conduit à examiner le dosage de l'arginine et de l'histidine en solutions pures, puis dans des mélanges d'arginine et d'histidine.

Nous avons fait précéder notre travail d'une étude critique des méthodes de fractionnement et des méthodes spécifiques de dosage de ces deux acides diaminés. Au cours de cette étude, nous examinons particulièrement certaines méthodes utilisées par de nombreux auteurs et nous recherchons si les critiques qui leur étaient adressées étaient justifiées.

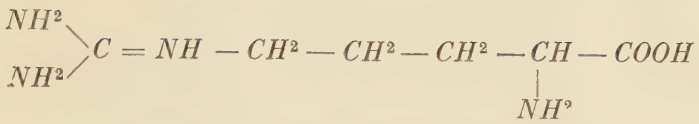
Nous donnons ensuite le résultat de nos expériences sur l'étude particulière de la séparation de l'arginine et de l'histidine à l'état de sels d'argent, puis à l'état de composés mercuriques et nous terminons par l'examen des résultats que peut donner l'extraction par l'alcool butylique.

On peut grouper les méthodes qui dosent les acides aminés en deux groupes :

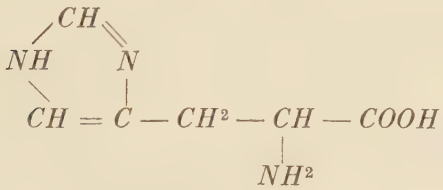
1° Les méthodes de fractionnement qui isolent successivement des groupes d'acides aminés jouissant de propriétés communes jusqu'à l'obtention de solutions ne contenant chacune qu'un acide aminé.

2° Les méthodes directes qui dosent directement un acide aminé dans un hydrolysat ou sur une partie de l'hydrolysat isolée au préalable, grâce à une propriété spécifique de l'acide aminé considéré.

Nous avons donc étudié successivement les méthodes de fractionnement, puis les méthodes directes de dosage de l'arginine et de l'histidine dont nous rappelons les formules :



Arginine ou acide guanidino α-aminovalérique



Histidine ou acide β-imidasol α-aminopropionique

* * *

Avant de commencer l'exposé de ce travail, nous tenons à exprimer notre reconnaissance à M. le Professeur Fabre qui nous a guidé de ses précieux conseils et nous a fait l'honneur de présider notre thèse.

Nous adressons nos remerciements à M. le Professeur H. Hérissey pour la bienveillance qu'il nous a toujours témoignée.

Nous remercions M. le Professeur agrégé P. Fleury qui a bien voulu accepter d'examiner notre thèse et M. H. Penau pour les matières premières qu'il a généreusement mises à notre disposition.

Ce travail a été effectué dans le laboratoire de Biochimie de l'Institut de Biologie physico-chimique (Fondation E. de Rotschild) ; que les Directeurs MM. J. Perrin, G. Urbain, A. Mayer et P. Girard veuillent bien accepter l'expression de notre gratitude.

C'est avec un vif regret que nous quittons ce laboratoire. Les directives éclairées de M. le Professeur Aubel, les conseils amicaux de Mme Y. Khouvine, nous ont permis de mener à bien ce travail. Nous les assurons de notre profonde reconnaissance.

SOMMAIRE

I. Etude critique des méthodes de fractionnement des acides aminés.

II. Etude critique des méthodes de dosage direct de l'arginine.

III. Etude critique des méthodes de dosage direct de l'histidine.

IV. Etude de la séparation de l'arginine et de l'histidine à l'état de sels d'argent.

V. Etude de la séparation de l'arginine et de l'histidine à l'état de composés mercuriques.

VI. Etude de l'extraction des acides aminés par l'alcool butylique.

VII. Conclusions.

I

Etude critique des méthodes de fractionnement des acides aminés.

MÉTHODE D'HAUSMANN

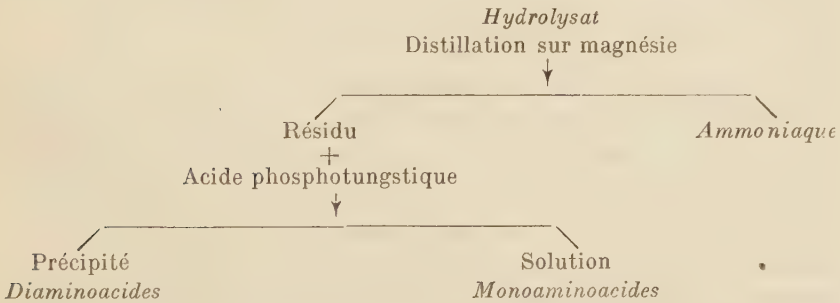
En 1899, Hausmann [3] eut l'idée, sur les hydrolysats protéiques, après détermination de l'ammoniaque par distillation sur magnésie, de rechercher la répartition de l'azote dans le précipité phosphotungstique et dans le filtrat résiduel par le procédé suivant :

1° Détermination de l'ammoniaque par distillation sur magnésie.

2° Précipitation par l'acide phosphotungstique :

le précipité phosphotungstique est formé des phosphotungstates d'arginine, d'histidine et de lysine.

les eaux-mères contiennent la leucine, la tyrosine, l'asparagine et l'acide glutamique.



La même année, Gulewitsch [4], dans un travail d'ensemble sur l'arginine étudia la précipitation de cet acide aminé par l'acide phosphotungstique, en particulier en présence d'acide sulfurique.

L'année suivante, Kutscher [5] montre que suivant la concentration en acide phosphotungstique, la précipitation peut varier et même devenir nulle. Il détermine en outre la solubilité du précipité dans les eaux de lavage. Puis Wetzel [6] reprend les expériences d'Hausmann et trouve des résultats variant du simple au double selon la concentration du réactif précipitant. Il en conclut que : « La quantité d'azote obtenue est trop basse pour les solutions diluées, trop forte pour les solutions concentrées ; dans un cas, tout n'est pas précipité, dans l'autre, d'autres amino-acides précipitent probablement. » Ceci explique que Chittenden et Eustis [7] n'obtiennent pas de résultats constants en appliquant la méthode d'Hausmann.

Cette incertitude de la méthode d'Hausmann est bien mise en évidence par Schulze et Winterstein [8] à l'occasion d'une étude comparée du dosage des acides diaminés par la méthode d'Hausmann et par la méthode de Kossel et Kutscher [9]. Ils montrent que la méthode argentique donne des résultats nettement plus faibles que la méthode phosphotungstique et que ceci est dû au fait que le précipité de phosphotungstates de bases hexoniques entraîne de la leucine et de la tyrosine qui, en solution pure, ne précipitent pas. Des résultats analogues sont obtenus par Gortner et Sandstrom [10] qui montrent, sur un mélange d'acides aminés purs, que le tryptophane et la proline sont partiellement entraînés.

Pourtant Osborne et Harris [11] infirment certains résultats de Kutscher [5] : le précipité est insoluble dans un excès d'acide phosphotungstique. Les résultats obtenus sont constants si la précipitation est effectuée avec un gros excès de réactif.

En 1911, Van Slyke [12] modifie la méthode ; il précipite les bases hexoniques en milieu chlorhydrique, dissout le précipité par la chaleur, puis le laisse cristalliser pendant 48 heures, temps nécessaire pour la précipitation maxima de l'histidine. Le précipité est lavé avec une solution aqueuse à 3,5 % d'acide chlorhydrique et 2,5 % d'acide phosphotungstique. Mais il y a une perte due à la solubilité des phosphotungstates d'arginine et d'histidine. Ceci conduit Van Slyke à effectuer, peu après [13], les lavages avec la même solution refroidie à 0°. La perte par solubilité des phosphotungstates dans les eaux de lavage est alors réduite de trois quarts. Il faut prendre garde de ne pas effectuer la précipitation elle-même

à 0° sous peine d'entraîner la phénylalanine et la proline, inconvénient confirmé par Gortner et Hoffmann [14].

En 1920, Hanke et Koessler [15] étudient le phosphotungstate d'histidine : le temps et la température sont les principaux facteurs de sa précipitation. Mais Plimmer et Rosedale [16] nient l'effet de la température sur la précipitation des bases hexoniques par l'acide phosphotungstique. Ils effectuent les lavages avec de l'acide chlorhydrique dilué, les résultats étant les mêmes qu'avec une solution d'acide phosphotungstique. Ils montrent ensuite [17] que la méthode de dosage de l'arginine de Van Slyke (1) donne des résultats plus élevés sur un hydrolysat que sur le précipité phosphotungstique obtenu à partir de ce dernier. La différence se retrouve presque toujours en effectuant le dosage sur les eaux-mères de précipitation des phosphotungstates ; elle est due, soit à la solubilité du phosphotungstate d'arginine, soit à la présence d'un acide aminé réagissant comme l'arginine aux réactifs de la méthode de Van Slyke, mais non précipitable par l'acide phosphotungstique. En outre Davies [18] établit que les corrections de solubilité de Van Slyke [10] sont trop faibles et exige une recristallisation du phosphotungstate pour l'obtenir exempt d'acides monoaminés.

Enfin Kernot et Knaggs [19] étudient la précipitation phosphotungstique des hydrolysats de protéides et concluent :

1° La précipitation est proportionnelle à la quantité d'azote de la solution, sauf pour les hydrolysats concentrés de gélatine.

2° La précipitation est plus complète à la température du laboratoire qu'à chaud.

3° La précipitation dépend de la concentration de l'acide utilisé pour l'hydrolyse et du temps de contact préalable.

Et ils reprennent l'opinion de Knaggs [20] qui croit que l'hydrolyse conduite sous certaines conditions donne naissance à des peptides précipitables par l'acide phosphotungstique.

Critiques.

La précipitation phosphotungstique des diaminoacides est assez discutée. Les critiques portent sur deux points principaux :

1° Solubilité des phosphotungstates ;

2° Entraînement des acides monoaminés.

1° *La solubilité des phosphotungstates* doit être envisagée dans deux conditions différentes : en solution pure et dans un hydrolysat.

ARGININE :

En solution pure, le phosphotungstate d'arginine serait soluble à 2,2 mgr. % d'après Gulewitsch [4], à 1,6 mgr. % d'après Van Slyke [10].

Nous avons cherché à déterminer cette solubilité en opérant en solutions très concentrées.

5 cm³ de solution d'arginine additionnés de 0,45 cm³ d'acide sulfurique pur sont traités dans un tube à centrifuger par une solution bouillante d'acide phosphotungstique dans 10 cm³ d'eau. On abandonne à la température du laboratoire et on centrifuge après 48 heures de repos.

Eau cm3	Arginine mgr.	SO_4H_2 cm3	Acide phosphotungstique dans 10 cm3 d'eau gr.	Arginine dissoute mgr.
5	60	0,45	0,50	14,4
5	60	0,45	1	1
5	60	0,45	2	0,7
5	60	0,45	3	0,2

La solubilité est fonction de la quantité d'acide phosphotungstique ajoutée : en précipitant par 3 gr. d'acide phosphotungstique, elle est de 1,3 mgr. %.

Sur un hydrolysat. — Plimmer et Rosedale [15] ont montré que sur des prises d'essai de 210 mgr. à 430 mgr. d'arginine, 61 mgr. à 148 mgr. échappent à la précipitation réalisée dans les conditions décrites par Van Slyke : précipitation dans 200 cm³ de solution et lavages avec 50 cm³ d'eau chlorhydrique.

HISTIDINE :

En solution pure, le phosphotungstate d'histidine est soluble à 7,3 mgr. % (en histidine) d'après Van Slyke [10].

Hanke et Koessler [13] établissent que si l'histidine est précipitée à chaud par l'acide phosphotungstique, la fin de la précipitation s'effectuant à la température du laboratoire, la solubilité de l'histidine est de 19 mgr. % après 24 heures. Si la précipitation se fait à la glacière, la solubilité de l'histidine est de 3,4 mgr. % après

43 heures et reste fixe. Si l'on abandonne le précipité à la température du laboratoire (27-32°), la solubilité de l'histidine remonte à 18,4 mgr. %.

Nous avons recherché l'action de l'acide sulfurique sur la précipitation de l'histidine par l'acide phosphotungstique et si l'influence du temps était aussi considérable que l'indiquent les auteurs.

5 cm³ de solution d'histidine sont additionnés, dans un tube à centrifuger, de quantités variables d'acide sulfurique, puis traités par 10 cm³ de solution bouillante d'acide phosphotungstique à 40 %, le tout est abandonné 18 heures ou 60 heures à la température du laboratoire, puis centrifugé.

Expérience sur 18 heures.

Eau cm³	Histidine mgr.	SO^4H^2 cm³	Acide phosphotungstique 40 % mc³	Histidine dissoute mgr.	Solubilité de l'histidine % mgr.
5	50,5	0,2	10	2,3	15,3
5	50,5	0,45	10	2,6	17,3
5	50,5	0,70	10	2,1	14
5	50,5	1	10	2,1	14

Expérience sur 60 heures.

Eau cm³	Histidine mgr.	SO^4H^2 cm³	Solution d'acide phosphotungstique 40 % cm³	Histidine dissoute mgr.	Solubilité de l'histidine % mgr.
5	50,5	0	10	2,2	14,6
5	50,5	0,2	10	2,1	14
5	50,5	0,45	10	2	13,3
5	50,5	0,70	10	2,3	15,3

Les précipités de la série d'expériences portant sur 18 heures ont été lavés avec 10 cm³ d'une solution sulfurique de titre variable.

SO^4H^2 %	Histidine dissoute % mgr.
1,25	11,4
2,5	14,6
5	15,5
10	10,8

Nos résultats confirment ceux obtenus jusqu'ici sur la solubilité du phosphotungstate d'histidine quant à sa valeur et à l'influence

de l'acide sulfurique. Par contre, il est certain qu'en solutions concentrées la précipitation de l'histidine par l'acide phosphotungstique atteint son maximum en 18 heures, alors qu'en solutions diluées, les auteurs ne l'estiment complète qu'après 48 heures.

Dans les hydrolysats, aucun travailleur ne donne de chiffres sur la solubilité du phosphotungstate d'histidine.

2° *L'entraînement des acides monoaminés* dans le précipité phosphotungstique a été mis en évidence par de nombreux auteurs : « Leucine et tyrosine » par Schulze et Winterstein [8], « Tryptophane et proline » par Gortner et Sandstrom [10].

Conclusions.

Nous avons confirmé la solubilité des phosphotungstates d'arginine et d'histidine en solutions pures ; nous nous étions cependant placé dans les meilleures conditions propres à obtenir une précipitation totale ; solutions concentrées et gros excès de réactif précipitant et nous avons établi que, dans ces conditions, en 18 heures la précipitation du phosphotungstate d'histidine est terminée. La précipitation phosphotungstique des acides diaminés, tant à cause de la solubilité des produits formés qu'à cause de l'entraînement d'acides monoaminés, ne peut servir de méthode de base pour un fractionnement dans une méthode exacte de dosage.

BIBLIOGRAPHIE

3. Hausmann W. — Uber die Verteilung das Stickstoffs im Eiweissmolekül. *Ztschr. für Physiol. Chem.*, 1899, **27**, 95.
4. Gulewitsch W. — Uber das Arginin. *Ztschr. für Physiol. Chem.*, 1899, **27**, 178.
5. Kutscher Fr. — Uber die Verwendung der Phosphorwolframsäure be. quantitativen Bestimmungen der Spaltangsprodukte des Eiweisesi *Ztschr. für Physiol. Chem.*, 1900-1901, **31**, 215.
6. Wetzel G. — Die organischen Substanzen der Schaalen von Mytilus und Pinna. *Ztschr. für Physiol. Chem.*, 1900, **29**, 386.
7. Chittenden R. H. and Eustis A. C. — The proportion of basic nitrogen yielded by elastin on decomposition with hydrochloric acid. *Am. J. Physiol.*, 1900, **3**, XXXI.
8. Schulze E. et Winterstein E. — Uber das Verhalten einiger Monoaminosäuren gegen Phosphorwolframsäure. *Ztschr. für Physiol. Chem.*, 1901, **33**, 574.

9. Kossel A. et Kutscher F. — Beiträge zur Kenntniss der Eiweisskörper. *Ztschr. für Physiol. Chem.*, 1900, **31**, 165.
10. Gortner R. A. et Sandstrom W. M. — Prolin and trytophan as factors influencing the accuracy of Van Slyke's method for the determination of nitrogen distribution in proteins. *J. of the Am. Chem. Society*, 1925, **47**, 1663.
11. Osborne T. B. et Harris I. F. — Nitrogen in protein bodies. *J. of the Am. Chem. Society*, 1903, **25**, 323.
12. Van Slyke D. D. — The analysis of proteins by determination of the chemical groups characteristic of the different amino-acids. *J. of biol. Chem.*, 1911-1912, **10**, 15.
13. Van Slyke D. D. — Improvements in the method for analysis of proteins by determination of the chemical groups characteristic of the different amino-acids. *J. of biol. Chem.*, 1915, **22**, 281.
14. Gortner R. A. et Hoffman W. F. — Evidence of a new amino-acid in proteins. *J. of the Am. Chem. Society*, 1925, **47**, 580.
15. Hanke M. T. et Koessler K. K. — Studies on proteinogenous amines. VII. The quantitative colorimetric estimation (of histidine in protein and protein containing matter. *J. of biol. Chem.*, 1920, **43**, 527.
16. Plimmer R. H. A. et Rosedale J. L. — Analysis of proteins. V. Van Slyke's method of determination of nitrogen distribution. *Biochem. J.*, 1925, **19**, 1004.
17. Plimmer R. H. A. et Rosedale J. L. — Analysis of proteins. VII. Direct estimation of arginine. *Biochem. J.*, 1925, **19**, 1020.
18. Davies W. L. — The titration of protein hydrolysates. *Biochem. J.*, 1927, **21**, 815.
19. Kernot J. C. et Knaggs J. — The estimation of the diaminonitrogen in the products of hydrolysis of proteins. *Biochem. J.*, 1928, **22**, 528.
20. Knaggs J. — Some notes on the determination of the Hausmann numbers of proteins. *Biochem. J.*, 1923, **17**, 488.

MÉTHODE DE KOSSEL ET KUTSCHER

Kossel et Kutscher [9] ont donné en 1900 la première méthode de fractionnement aboutissant au dosage individuel des bases hexoniques.

Ce dosage comprend quatre parties :

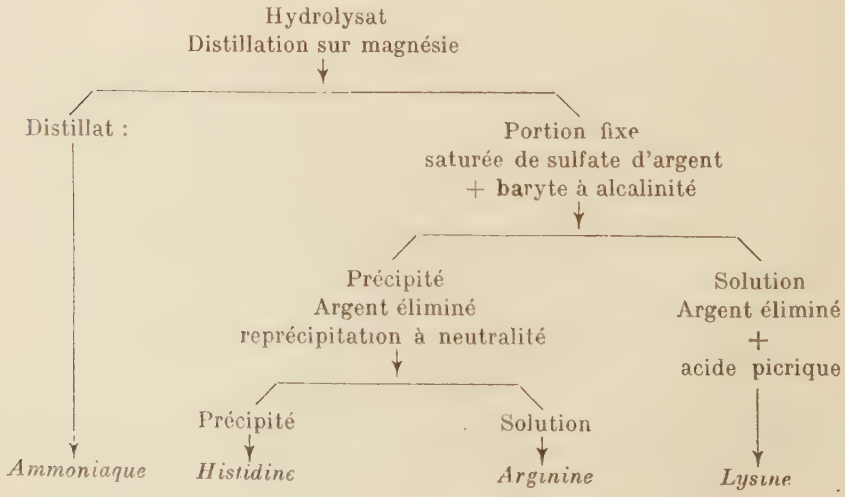
1° Hydrolyse des protéides par l'acide sulfurique à l'ébullition ;

2° Elimination de l'acide sulfurique par la baryte, puis distillation sur magnésie et dosage de l'ammoniaque ;

3° Précipitation de l'arginine et de l'histidine à l'état de sels d'argent ;

4° Dosages après isolement, de l'arginine, de l'histidine et de la lysine.

Pour l'obtention des sels d'argent, la solution est saturée de sulfate d'argent, puis alcalinisée fortement par la baryte. Le précipité est privé d'argent par l'hydrogène sulfuré en milieu acide. Après concentration, la solution est traitée par le nitrate d'argent, puis par la baryte jusqu'à neutralisation exacte. L'opération se termine par l'addition d'un léger excès de baryte.



Le précipité contient l'histidine, la solution, l'arginine à l'état de sels d'argent.

Le précipité est privé d'argent par l'hydrogène sulfuré en milieu acide, puis l'histidine isolée à l'état de dichlorhydrate.

La solution est traitée de même, puis l'arginine estimée par son azote total, dosage polarimétrique, pesée du nitrate acide ou du nitrate neutre.

Plus tard Kossel et Patten [2] emploient le nitrate d'argent comme source d'argent au lieu de sulfate d'argent et Kossel et Pringle [32], puis Weiss [23] utilisent le carbonate de baryum à la place de la baryte.

Osborne, Leavenworth et Brautlecht [24] estiment que la séparation argentique de l'arginine et de l'histidine est meilleure s'il ne reste que très peu d'histidine en solution en éliminant d'abord la majeure partie de l'histidine par le sulfate mercurique. Ils montrent en outre qu'en milieu argentique, la précipitation de l'histidine est optima pour l'obtention d'une juste neutralité par la baryte.

Hopkins et Savory [25] remarquent qu'en additionnant les solutions argentiques d'acides diaminés de baryte jusqu'à la neutralité, toute l'histidine n'est pas précipitée et que la précipitation totale est atteinte par addition supplémentaire de baryte.

Kossel et Eldbacher [26] examinent la précipitation argentique de l'arginine et de l'histidine par la baryte en fonction de l'alcalinité indiquée par le virage du tournesol, de la phénolphtaléine et du bleu de thymolphtaléine. Ils résument leurs résultats dans le tableau suivant :

	Neutralité au tournesol	Virage au rouge de la phénolphtaléine	Bleu de thymolphtaléine
Histidine	précipite	précipitation terminée	
Arginine.....	ne précipite pas	ne précipite pas	précipitation terminée

Vickery et Leavenworth [27] n'acceptent pas ces résultats. L'histidine serait ainsi précipitée entre *pH* 8,3 et *pH* 9,3. Or, Weiss [23] a montré que par ébullition avec le carbonate de baryum, l'histidine est entièrement précipitée et que, d'autre part, l'arginine commence à précipiter dès le virage de la phénolphtaléine. Ils émettent l'hypothèse que la précipitation est une fonc-

tion du *pH* et se proposent de rechercher la valeur pour laquelle l'arginine ne précipite pas, l'histidine ayant entièrement précipité. Ils fixent ce *pH* à 7 [28] et calculent la solubilité de l'arginate et de l'histidinate d'argent dans l'eau de baryte saturée. Peu après [29], ils modifient leur méthode et effectuent la séparation à $pH = 7,4$ avec reprécipitation à $pH = 7,2$ du précipité, afin d'éviter toute perte d'histidine précipitée ensuite par le réactif d'Hopkins. Entre temps [30], ils substituent l'oxyde d'argent au sulfate d'argent, méthode indiquée par Kiesel [31].

Rosedale [32] précipite l'histidinate d'argent par la baryte en milieu acide (1,5 % en acide sulfurique ou acétique) et remarque qu'à $pH = 7$, l'arginine a commencé sa précipitation.

Cahn et Bonot [33] critiquent l'isolement de l'arginine et de l'histidine à l'état de sels d'argent à cause de la solubilité de ces composés.

Block [34] précipite directement l'histidine par le nitrate d'argent et la baryte sans faire une précipitation préalable de l'arginine et de l'histidine.

Etude critique de la méthode.

Les principales critiques faites à cette méthode sont la solubilité des sels d'argent de l'arginine et de l'histidine, et surtout la difficulté d'effectuer une précipitation fractionnée des deux sels.

La première objection est levée par l'emploi de l'oxyde d'argent qui permet de travailler sur de très faibles volumes. Cependant, l'école de Vickery n'a pas adopté les méthodes à l'oxyde d'argent, puisque Block [34] utilise le nitrate d'argent.

La deuxième objection, difficulté de faire une précipitation fractionnée des deux amino-acides, est étudiée plus loin, Nos résultats ne sont pas en faveur de cette méthode, l'arginate d'argent ayant commencé sa précipitation alors que l'histidinate d'argent n'est pas entièrement précipité.

Il reste néanmoins que les résultats obtenus par Vickery et Leavenworth [28] sur des mélanges d'acides aminés sont bons, mais il faut remarquer que les auteurs font subir aux chiffres deux corrections :

1° une correction de solubilité pour l'arginine. L'arginate d'argent est soluble dans l'eau de baryte saturée à raison de

0,036 gr. par litre [4], mais cette solubilité devient négligeable quand le *pH* de la solution est de 10,97 [28], point isoélectrique de l'arginine [35] ;

2° une correction d'entraînement de l'histidine par l'arginine évaluée à 4 % environ.

Or, d'une part, les expériences ayant été effectuées sur des quantités d'arginine et d'histidine en rapports toujours semblables (1 partie d'histidine pour 2 parties d'arginine), d'autre part l'influence de la correction de solubilité pour l'arginine étant très importante comme on peut le constater dans les deux séries d'analyses suivantes, enfin, la correction de solubilité devenant nulle pour une alcalinité donnée ($pH = 10,97$), ce qui prouve qu'elle est fonction du *pH* ; nous avons peu confiance en cette correction qui peut atteindre 10 %.

Block et Vickery [36]. *Analyses de kératine.*

	Arginine non corrigée	Arginine corrigée
Laine de mouton	7,8 %	8,6 %
Peau de serpent	5,4 %	6,7 %
Plumes d'oie	4,8 %	5 %
Gorgonia flabellum	6,4 %	7,3 %
Plexaurella dichotoma	5,4 %	6,6 %

Block [34]. *Analyses de kératine.*

	Arginine non corrigée	Arginine corrigée
Ongle du doigt	8,45 %	9,3 %
Corne de bestiaux	9,4 %	9,8 %

Conclusion.

Par le manque de netteté de la précipitation fractionnée de l'arginine et de l'histidine, par la solubilité des sels d'argent de ces amino-acides, les méthodes argentiques ne nous semblent pas convenables pour un dosage exact des bases hexoniques.

BIBLIOGRAPHIE

4. Gulewitsch W. — Uber das Arginin. *Ztschr. für Physiol. Chem.*, 1899, **27**, 178.
9. Kossel A. et Kutscher F. — Beiträge zur Kenntniss der Eiweisskörper. *Ztschr. für Physiol. Chem.*, 1900, **31**, 165.
21. Kossel A. et Patten A. J. — Zur Analyse der Hexonbasen. *Ztschr. für Physiol. Chem.*, 1903, **38**, 39.
22. Kossel A. et Pringle H. — Uber Protamine und Histone. III. Uber das Histon. *Ztschr. für Physiol. Chem.*, 1906, **49**, 314.
23. Weiss F. — Untersuchungen über die Bildung des Lachsprotamins. *Ztschr. für Physiol. Chem.*, 1907, **52**, 107.
24. Osborne T. B., Leavenworth C. S. and Brautlecht C. A. — The different forms of nitrogen in proteins. *Am. J. Physiol.*, 1908, **23**, 180.
25. Hopkins F. G. et Savory H. — A study of Bence-Jones protein, and of the metabolism in three cases of Bence-Jones protein-urin. Chemistry of the protein. *J. of Physiol.*, 1911, **42**, 217.
26. Kossel A. et Eldbacher S. — Uber die Trennung von Histidin und Arginin. *Ztschr. für Physiol. Chem.*, 1920, **110**, 241.
27. Vickery H. B. and Leavenworth C. S. — On the separation of histidin and arginine. *J. of biol. Chem.*, 1926, **68**, 225.
28. Vickery H. B. et Leavenworth C. S. — On the separation of histidin and arginine. II. The separation of the silver compounds at $pH=7{,}0$. *J. of biol. Chem.*, 1927, **72**, 403.
29. Vickery H. B. et Leavenworth C. S. — The basic amino-acids of horses hemoglobin. *J. of biol. Chem.*, 1928, **79**, 377.
30. Vickery H. B. et Leavenworth C. S. — Modifications for the determination of the basic amino-acids of proteins. The bases of edestin. *J. of biol. Chem.*, 1928, **76**, 707.
31. Kiesel A. — Zur methodik der Fällung von Basen als Silberverbindungen. *Ztschr. für Physiol. Chem.*, 1926, **161**, 147.
32. Rosedale J. L. — The amino-acids of fleisch. III. The diamino-acid content of fish. *Biochem. J.*, 1929, **23**, 161.
33. Cahn Th. et Bonot A. — Recherches sur les variations des équilibres des constituants cellulaires. IV. Techniques. *Ann. Phys. et physico Chim. biol.*, 1928, **4**, 822.
34. Block R. J. — The basic amino-acids of keratins. The basic amino-acid content of humen finger nails and cattle horn. *J. of biol. Chem.*, 1934, **104**, 339.
35. Hunter A. et Borsook A. — The dissociation constants of arginine. *Biochem. J.*, 1924, **18**, 883.
36. Block R. J. et Vickery H. B. — The basic amino-acids of proteins. A chemical relationship between various keratins. *J. of biol. Chem.*, 1931, **93**, 113.

MÉTHODE DE FRACTIONNEMENT DE VAN SLYKE

L'acide nitreux réagit sur les amino-acides en substituant une fonction alcool à une fonction amine avec libération d'azote

$$R - \underset{\underset{NH^2}{|}}{CH} - COOH + NO^2H = R - \underset{\underset{OH}{|}}{CH^2} - COOH + OH^2 + N^2$$

Tous les amino-acides réagissent quantitativement avec un atome d'azote nitreux, sauf la lysine qui réagit avec deux atomes, la proline et l'oxyproline qui ne réagissent pas du tout. Tous les amino-acides réagissent avec la totalité de leur azote aminé sauf le tryptophane qui réagit avec la moitié, l'histidine avec le tiers, l'arginine avec le quart. C'est sur ces données, jointes à la précipitation phosphotungstique des bases hexoniques et le dosage de l'arginine par ébullition avec la soude que Van Slyke [12 et 13] a établi sa méthode de fractionnement des acides aminés qui comporte les phases suivantes :

1° Séparation de l'ammoniaque par distillation sur magnésie ;
2° Traitement par l'acide phosphotungstique ;

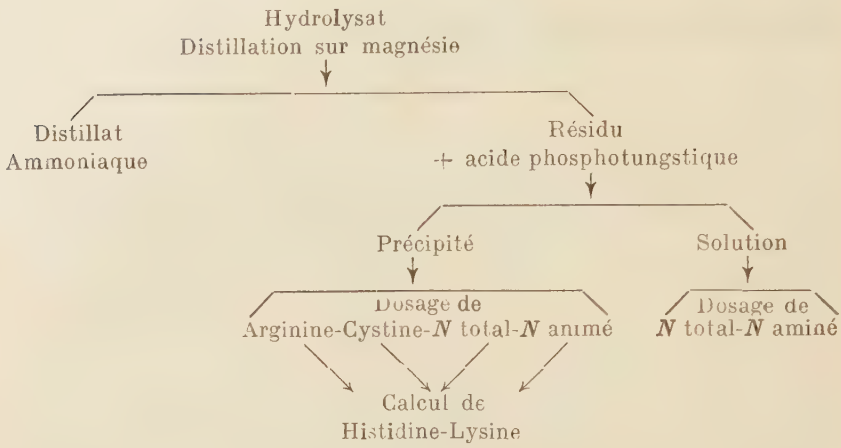
A. Sur le précipité :

a) dosage de l'arginine ;
b) dosage de la cystine par évaluation de son soufre ;
c) dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldahl ;
d) dosage de l'azote aminé total par l'acide nitreux ;
e) calcul de l'azote non aminé $D = N$. Kjeldahl. — N. nitreux ;
f) calcul de l'histidine. V. histidine $= 1{,}5\ [D - (1{,}125 \times N \text{ arginine})]$
g) calcul de la lysine. N. lysine $= N$. Kjeldahl $- (N$ arginine $+ N$ histidine $+ N$ cystine).

B. Sur la solution :

a) dosage de l'azote total ;

b) dosage de l'azote aminé.



Van Slyke admet trois corrections :

1° Une correction de solubilité pour les phosphotungstates ;

2° Une correction propre à chaque acide aminé quant à l'azote libéré par l'acide nitreux. La cystine, par exemple, libère 107 % de l'azote théorique ;

3° Une correction pour l'arginine due à la cystine qui traitée dans des conditions analogues libère 18 % d'azote estimé en arginine lors du dosage de l'arginine par la méthode à la soude.

Nous allons examiner successivement la valeur de ces corrections et les causes d'erreur non prévues par l'auteur.

1° Solubilité des phosphotungstates.

La solubilité a été établie sur des solutions pures, il est très probable que les mêmes coefficients ne peuvent être appliqués sur des mélanges d'acides aminés. De plus les phosphotungstates de bases hexoniques entraînent dans leur précipitation des acides monoaminés.

2° Action de l'acide nitreux sur les acides aminés.

Le temps nécessaire pour obtenir une réaction complète a donné lieu à de nombreuses controverses. Van Slyke [37] admet 5 mi-

nutes, sauf pour la lysine puis assure qu'en 30 minutes la réaction est complète pour tous les amino-acides [38].

Plimmer [39] estime que la lysine n'a entièrement réagi à 17° qu'au bout d'une heure et que l'arginine réagit avec un peu moins que le quart de son azote.

Mais la réaction est-elle spécifique ?

D'après Sekine [40] le groupe guanidine est attaqué et l'arginine réagit avec la moitié de son azote après 3 heures de réaction à 20°.

La réaction est-elle complète dans les milieux complexes des hydrolysats ?

Davies [18] titrant l'azote aminé par la méthode de Foreman [41] a toujours trouvé des résultats nettement supérieurs à ceux de Van Slyke.

3° Décomposition de la cystine.

En effectuant le dosage de l'arginine par la méthode de Van Slyke la cystine libère 18 % de son azote,mais sur la faible quantité de cet amino-acide, l'erreur est négligeable sauf pour les kératines.

4° Détermination de l'arginine.

La détermination de l'arginine est d'une exactitude peu rigoureuse dans les hydrolysats, l'expérience de Plimmer [17] qui obtient des résultats très différents selon que le dosage est effectué sur l'hydrolysat ou sur le précipité phosphotungstique ne donne guère confiance à la méthode.

5° Calcul par différence.

Deux amino-acides sont titrés directement, deux sont calculés. Il est évident qu'une erreur très faible dans le dosage de l'arginine ou de la cystine entraîne des erreurs énormes pour l'histidine et le lysine. La preuve en est dans ces 2 analyses de kératine, effectuées par la même méthode et rapportées par Van Slyke, puis reproduites par Mitchell et Hamilton [42].

	1910	1914
N. Cystine	1,95 %	0,20 %
N. Arginine	7,51 %	7,41 %
N. Histidine	4,24 %	6,21 %
N. Lysine	7,86 %	10,30 %

Conclusion.

La méthode de Van Slyke ne peut être retenue. Les nombreuses causes d'erreur, en particulier le calcul de deux des amino-acides, donnent à cette méthode une inexactitude extrême.

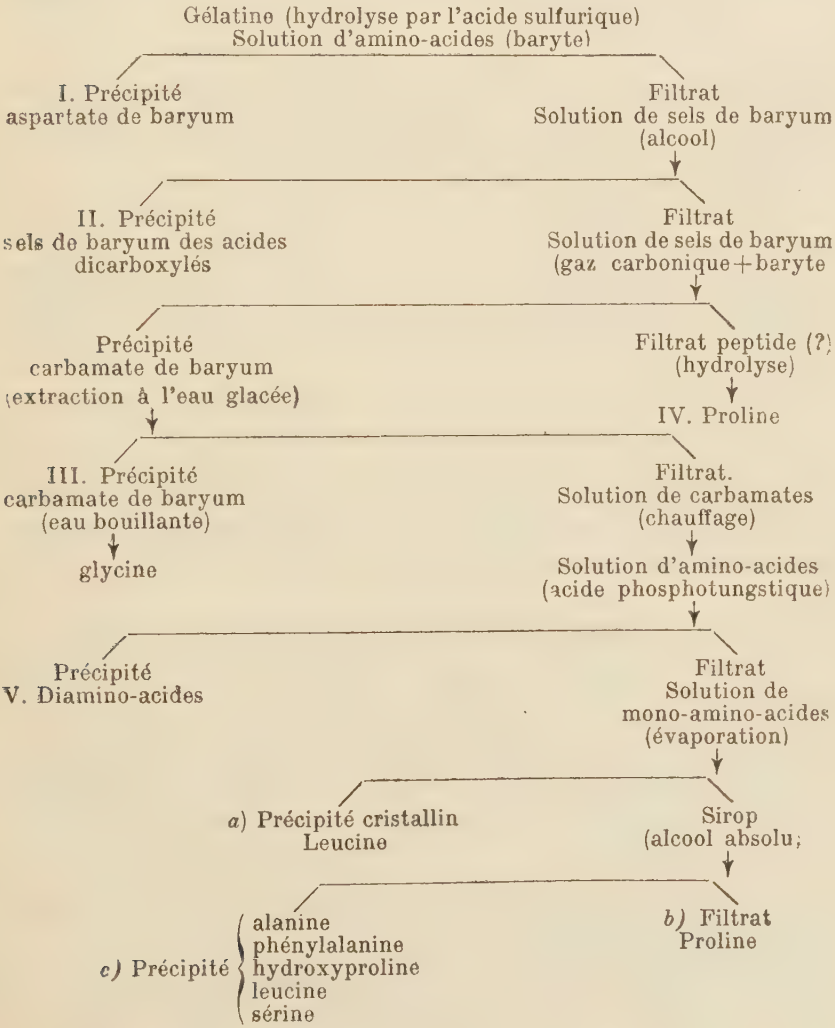
BIBLIOGRAPHIE

12. Van Slyke D. D. — The analysis of proteins by determination of the chemical group characteristic of the different amino-acids. *J. of biol. Chem.*, 1911-1912, **10**, 15.
13. Van Slyke D. D. — Improvements on the method for analysis of proteins by determination of the chemical groups characteristic of the different amino-acids. *J. of biol. Chem.*, 1915, **22**, 281.
17. Plimmer R. H. A. and Rosedale J. L. — Analysis of proteins. VII. Direct estimation of arginine. *Bioch. J.*, 1925, **19**, 1020.
18. Davies W. L. — The titration of Protein hydrolysates. *Bioch. J.*, 1927 **21**, 815.
37. Van Slyke D. D. — A method for quantitative determination of aliphatic amino-groups. *J. of biol. Chem.*, 1911, **9**, 185.
38. Van Slyke D. D. — The quantitative determination of aliphatic amino-groups. *J. of biol. Chem.*, 1912, **12**, 275.
39. Plimmer R. H. A. — The analysis of proteins. II. The action of nitrous acid upon the hexone bases. *Bioch. J.*, 1924, **18**, 105.
40. Sekine H. — Reaction of nitrous acid upon arginine and formule for calculation of histidine. *Nogakukaiho.* Tokio, 1919, 1, 197, d'après *Chem. Abstract.*, 1921, **15**, 243.
41. Foreman F. V. — Rapid volumetric methods for the estimation of amino-acids, organic-acids and organic bases. *Bioch. J.*, 1920, **14**, 451.

MÉTHODES DE SCHRYVER

En 1921, Buston et Schryver [43] traitant les produits d'hydrolyse des protéides par la baryte et le gaz carbonique en milieu alcoolique, précipitent les amino-acides à l'état de carbamates.

La méthode de fractionnement utilisée, perfectionnée par la suite [44], est résumée dans le schéma suivant (étude sur la gélatine) :



En 1926, Schryver et Buston [45] ébauchent une nouvelle méthode basée sur la séparation des amino-acides par les sels de zinc et de cuivre. Ils distinguent grâce à leurs différences de solubilités :

1° les sels de zinc insolubles dans l'eau : leucine et phénylalanine ;
2° les sels de zinc légèrement solubles dans l'eau : leucine pure ;
3° les sels de zinc complètement solubles dans l'eau, mais insolubles dans l'alcool : alanine, valine ;
4° les sels de zinc complètement solubles dans l'eau et l'alcool. Ces derniers sont transformés en sels de cuivre et extraits à l'alcool méthylique.

En 1928, Town [46], élève de Schryver, tente une séparation des amino-acides par les sels de cuivre entrevue par les auteurs précédents et établit la classification suivante :

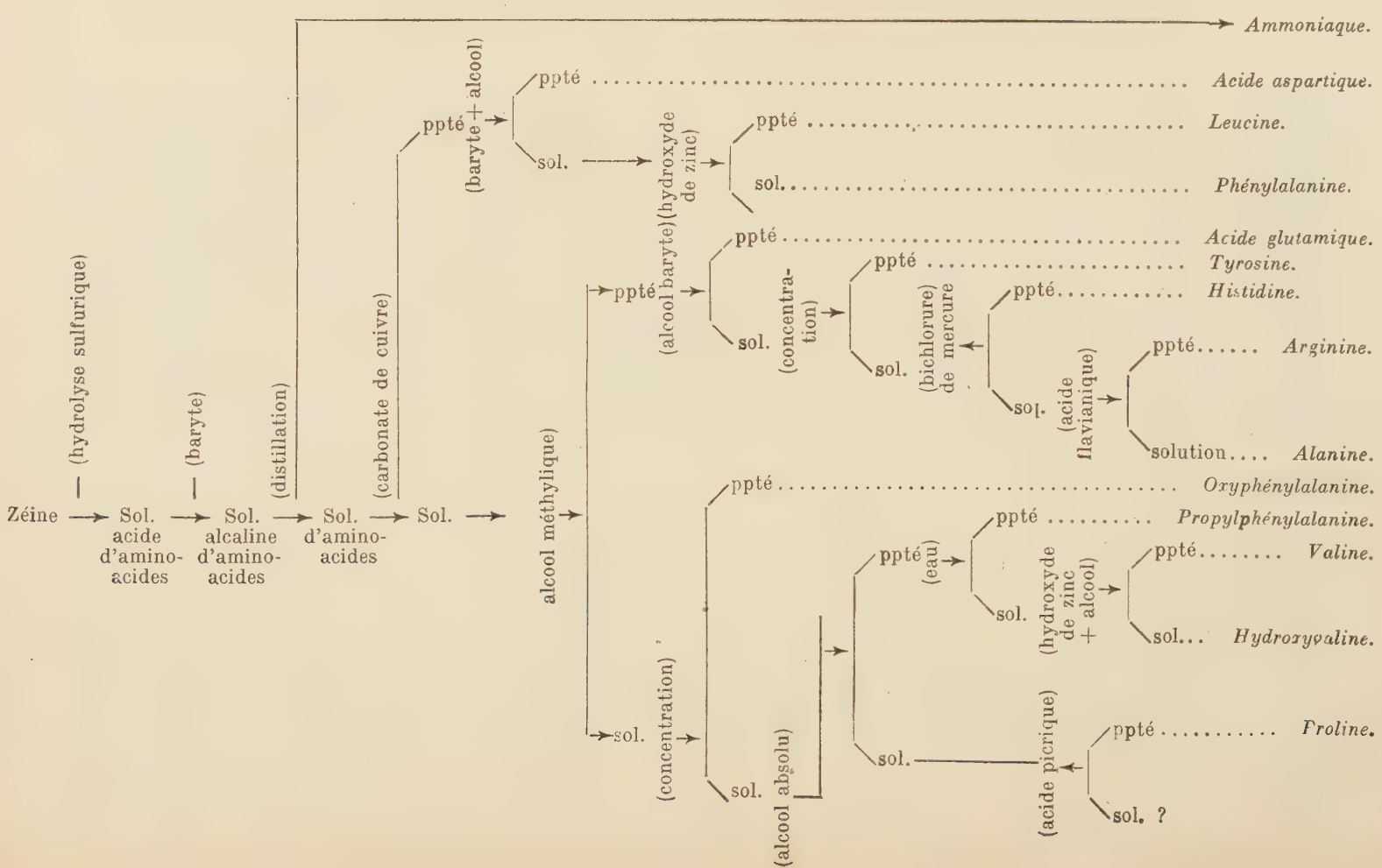
1° Sels de cuivre solubles dans l'eau et l'alcool méthylique : proline, valine, hydroxyvaline et phénylalanylproline ;
2° Sels de cuivre solubles dans l'eau et insolubles dans l'alcool méthylique : acide glutamique, bases hexoniques, glycine, alanine et sérine ;
3° Sels de cuivre insolubles dans l'eau et dans l'alcool méthylique : phénylalanine, leucine et acide aspartique.

En 1930, M. A. Burniston Brazier [47] donne une méthode complète de fractionnement des amino-acides utilisant les résultats obtenus par les auteurs précédents (*V. tableau p.* 31).

Nous ne ferons pas l'étude critique de la méthode aux carbamates qui a été abandonnée par ses auteurs et nous examinerons la méthode de M. A. B. Brazier.

Si on envisage les différents traitements subis par l'arginine et l'histidine au cours de cette méthode, nous constatons que deux propriétés importantes de ces amino-acides utilisées par les auteurs doivent être vérifiées :

1° Insolubilité des sels de cuivre de l'arginine et de l'histidine dans l'alcool méthylique ;
2° Précipitation de l'histidine par le bichlorure de mercure.


Zéine
(hydrolyse sulfurique)
Sol. acide d'amino-acides
(baryte)
Sol. alcaline d'amino-acides
(distillation)
Sol. d'amino-acides
(carbonate de cuivre)
Sol.
ppté
(baryte + alcool)
ppté
sol.
(hydroxyde de zinc)
ppté
sol.
Ammoniaque.
Acide aspartique.
Leucine.
Phénylalanine.
alcool méthylique)
ppté
(alcool baryte)
ppté
sol.
(concentration)
ppté
sol.
(bichlorure) de mercure
ppté
sol.
(acide flavianique)
ppté
solution
Acide glutamique.
Tyrosine.
Histidine.
Arginine.
Alanine.
sol.
(concentration)
ppté
sol.
(alcool absolu)
ppté
(eau)
ppté
sol.
(hydroxyde de zinc + alcool)
ppté
sol.
(acide picrique)
ppté
sol. ?
Oxyphénylalanine.
Propylphénylalanine.
Valine.
Hydroxyvaline.
Proline.

1° Solubilité de l'arginate et de l'histidinate de cuivre.

Nous avons étudié la solubilité de l'arginate et de l'histidinate de cuivre dans divers solvants. La technique pour l'obtention du sel de cuivre a été celle indiquée par M. A. B. Brazier :

100 mgr. environ d'amino-acide sont dissous dans 20 cm³ d'eau, puis traités par 3 gr. de carbonate de cuivre. On porte quelques instants à l'ébullition et on évapore au bain-marie. Le résidu, séché à l'acétone, puis 1/2 heure à l'étuve à 100°, est ensuite finement pulvérisé. Il est agité durant 1/2 heure avec 50 cm³ de solvant. L'amino-acide dissous est estimé par évaporation puis dosage de l'azote sur le résidu.

L'action des divers solvants étudiés a été résumée dans les tableaux suivants :

Arginine pesée en mgr.	Solvant	Arginine dissoute	Solubilité de l'arginine %
166	Alcool méthylique 98 99	17,6	0,035
86	Alcool méthylique sec	17,2	0,034
126	Alcool éthylique	4,6	0,009
107	Alcool isopropylique	0,2	insoluble
88	Alcool isoamylique	0,1	insoluble
104	Alcool butylique normal	0,3	insoluble
57	Ether de pétrole 30/70	0	insolubl
56	Chloroforme	0	insoluble
54	Acétone	0	insoluble

Histidine pesée en mgr.	Solvant	Histidine dissoute en mgr.	Solubilité de l'histidine %
106	Alcool méthylique sec	2	0,004
96	Alcool éthylique	0,8	0,002
132	Alcool isopropylique	0,2	insoluble
102	Alcool isoamylique	0,1	insoluble
102	Alcool butylique normal	0,2	insoluble
48	Ether de pétrole 30/70	0	insoluble
91	Chloroforme	0	insoluble
93	Acétone	0	insoluble

La solubilité de l'arginine et de l'histidine à l'état de sels de cuivre dans l'alcool méthylique est donc loin d'être négligeable.

2° Précipitation de l'histidine par le bichlorure de mercure.

Kossel [48] avait montré que l'histidine n'est plus précipitée intégralement par le bichlorure de mercure quand la dilution

dépasse 1/500. Nous avons vérifié la solubilité du complexe histidine-bichlorure de mercure :

0,097 gr. d'histidine sont dissous dans 20 cm³ d'eau, puis traités par 5 gr. de bichlorure de mercure dissous dans 80 cm³ d'eau bouillante. Après 24 heures de repos à la glacière, la solution privée de mercure par l'hydrogène sulfuré, est réduite par évaporation au bain-marie à 5 cm³. Dans le résidu, l'azote est dosé par la méthode de Kjeldahl.

Histidine	Histidine dissoute	
mgr.	mgr.	%
97	42,3	43,6

Nous avons recherché si, à ces concentrations inférieures à 1/500, la précipitation de l'histidine par le bichlorure de mercure est complète.

0,120 gr. d'histidine sont dissous dans 5 cm³ d'eau et traités par 1 gr. de sublimé dissous dans 15 cm³ d'eau bouillante. Après 24 heures de repos à la glacière, on filtre. La solution, privée de mercure par l'hydrogène sulfuré, est réduite à 5 cm³ par évaporation au bain-marie. Dans le résidu, l'azote est dosé par la méthode de Kjeldahl.

Histidine	Histidine dissoute	
mgr.	mgr.	%
120	46,2	38,5

Même à une concentration de 0,6 %, la précipitation de l'histidine par le bichlorure de mercure n'est pas complète.

Conclusion.

La méthode de M. A. B. Brazier qui est la méthode préconisée par l'école de Scrhyver ne saurait être retenue pour des dosages sur des quantités d'amino-acides ne dépassant pas 0,10 gr.

Nous avons montré que deux des principaux facteurs de séparation ne présentent pas une exactitude suffisante.

1° L'arginine et l'histidine traitées par le carbonate de cuivre, puis par l'alcool méthylique, passent en solution dans ce solvant. L'arginine est soluble à raison de 0,035 gr. dans 100 cm³ et l'his-

tidine à raison de 0,004 gr. Une étude sur la solubilité dans des solvants organiques, en particulier les alcools supérieurs, a permis de montrer l'insolubilité de l'arginine et de l'histidine à l'état de sels de cuivre dans ces derniers.

2° La précipitation de l'histidine par le bichlorure de mercure est loin d'être totale, bien que nous nous soyons placé dans les conditions les meilleures : solutions concentrées et gros excès de réactif précipitant.

BIBLIOGRAPHIE

43. Buston H. W. and Schryver S. B. — A method for the separation of amino-acids from the products of hydrolysis of proteins and other sources. Preliminary communication. *Bioch. J.*, 1921, **15**, 636.
44. Kingston H. L. et Schryver S. B. — Investigations on gelatin. Part. III. The separation of the products of hydrolysis of gelatin by the carbamat method. *Bioch. J.*, 1924, **18**, 1070.
45. Schryver S. B. and Buston H. W. — The isolation of some hiterto undescribed products of hydrolysis of proteins. Part. II. *Proceed. of the Royal Soc. of London. B.*, 1926, **99**, 476).
46. Town B. W. — The isolation of pure I-prolin. *Biochem. J.*, 1928, **22**, 1083.
47. Burniston Brazier M. A. — A new method for the separation of the products of protein hydrolysis. *Biochem. J.*, 1930, **24**, 1188.
48. Kossel A. — Ueber die constitution der einfachsten Eiweissstoffe. *Ztschr. für Physiol. Chem.*, 1898, **25**, 165.

MÉTHODE DE DAKIN

En 1918, Dakin [49], extrayant les hydrolysats de protéides par l'alcool butylique, classe les acides aminés en cinq groupes :

1° Acides monoaminés insolubles dans l'alcool, extraits par l'alcool butylique ;

2° Proline soluble dans l'alcool, extraite par l'alcool butylique ;

3° Dicétopipérazines extraites par l'alcool butylique mais séparables de la proline par solutions fractionnées dans l'eau et l'alcool ;

4° Acides aminés diacides non extraits par l'alcool butylique ;

5° Acides diaminés non extraits par l'alcool butylique et précipités par l'acide phosphotungstique.

L'extraction d'abord conduite à la pression ordinaire est ensuite effectuée sous pression réduite [50] afin d'éviter la cyclisation des monoaminoacides.

Osborne, Leavenworth et Nolan emploient ensuite l'agitation simple avec l'alcool butylique [51]. L'extraction conduite à $pH = 6$ permet d'isoler les acides mono-aminés et dicarboxylés.

Cohn [52] reprenant les méthodes de Dakin, constate qu'à $pH = 3$ les acides dicarboxylés sont extraits et donne le tableau suivant :

Extraction butylique à $pH = 6$

- Extrait : Proline. Dicétopipérazine Monoaminoacides.
- Résidu : Extraction butylique à $pH = 3$
  - Extrait : Acide asparagique, Acide glutamique, Acide oxyglutamique
  - Résidu : Histidine, Arginine, Lysine

L'étude critique de l'extraction par l'alcool butylique est exposée dans un chapitre ultérieur.

BIBLIOGRAPHIE

49. Dakin H. D. — On aminoacids. *Bioch. J.*, 1918, **12**, 290.
50. Dakin H. D. — Amino-acids of gelatin. *J. Biol. Chem.*, 1920, **44**, 499.
51. Osborne I. B. and Leavenworth C. S. and Nolan L. S. — A note on Dakin's method as applied to edestin. *J. of Biol. Chem.*, 1924, **61**, 309.
52. Cohn E. J. — Die Bestimmung der Aminosäuren in den Eiweisskörpern. Bestimmung den Aminosäuren in bestimmten Proteinen. *Erg. der Physiol.*, 1932, **33**, 870.

II

Étude critique des méthodes directes de dosage de l'arginine.

MÉTHODE D'ORGLMEISTER

L'action des permanganates sur les protéides a été étudiée par Béchamp [53] qui, en 1856, obtient du nitrate d'urée en traitant la fibrine par le permanganate de potassium.

Stadeler [54] ne peut reproduire les expériences de Béchamp et conclut que le chimiste français a dénommé nitrate d'urée des cristaux d'acide benzoïque.

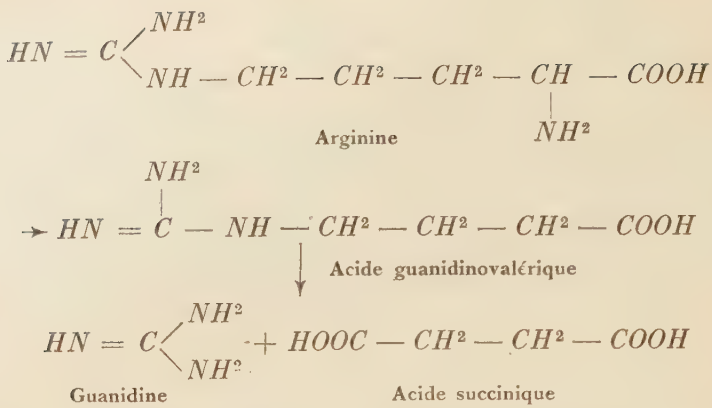
Béchamp [55], en 1871, refait son expérience et conclut à la présence certaine d'urée.

Loew [56] ne peut à nouveau obtenir d'urée et croit que le corps identifié par Béchamp comme nitrate d'urée est du nitrate de baryum et Kolbe [57] attribue la différence dans les résultats aux manipulations défectueuses de Béchamp.

Enfin Ritter [58] confirme les expériences de Béchamp. Il identifie l'urée par la formation de nitrate et d'oxalate. Il montre que les auteurs allemands ont opéré à des températures trop élevées. Dans ces conditions, il y a formation de gaz carbonique et d'ammoniaque.

Béchamp [59], dans un mémoire sur les matières albuminoïdes, obtient de l'urée à partir de nombreux protéides.

Dans cette polémique, les autres composés formés dans la réaction ne sont pas étudiés. Leur étude est entreprise dix ans plus tard, par Lossen [60] qui, par l'action du permanganate de potassium et du sulfate de sodium sur les protéides, obtient de la guanidine. Cette base est identifiée par son picrate.



Bien que Pommerenig [61] ne puisse obtenir de guanidine, l'existence en est confirmée par Zickgraf [63] qui oxyde les protéides par le permanganate de calcium. Il donne la préférence à ce réactif car le potassium donne avec l'acide picrique un sel difficilement séparable du picrate de guanidine et le permanganate de baryum contient toujours un peu de permanganate de potassium. Il obtient de la guanidine aux dépens de nombreux protéides.

Bénech et Kutscher [62], étudiant l'action du permanganate de baryum sur l'arginine, découvrent de la guanidine parmi les produits obtenus. L'arginine serait un produit intermédiaire d'oxydation entre les protéides et la guanidine.

Ceci conduit Otori [64], à essayer de doser l'arginine par sa transformation en guanidine. Il ajoute des quantités croissantes de permanganate de calcium à des mêmes quantités de protéide. Les quantités de guanidine obtenues sont très variables ; ce qui le conduit à abandonner la méthode.

Cependant Orglmeister [65] décrit une technique où l'addition de permanganate à la matière protéique se fait de façon que la solution ne soit pas colorée au bout de 15 minutes, mais colorable en rose par quelques gouttes de permanganate.

Dans ces conditions, la guanidine obtenue est sensiblement constante pour un même échantillon.

Cette méthode, abandonnée par la suite, ne peut pas offrir de garanties suffisantes pour un dosage exact de l'arginine. La formation de la guanidine n'est peut-être pas quantitative et l'action du permanganate peut pousser facilement l'oxydation à un stade ultérieur.

Cette méthode doit cependant être citée puisqu'elle a permis à Orglmeister de donner de nombreux chiffres pour les teneurs en arginine des protéides.

BIBLIOGRAPHIE

53. Béchamp A. — Extrait d'une thèse sur les substances albuminoïdes et sur leur transformation en urée. *Ann. Ch. Ph.*, 1856, 3, **48**, 348.
54. Stadeler G. — Kleinere mitteilungen. *J. für Prakt. Chem.*, 1857, **72**, 250.
55. Béchamp A. — Sur la formation de l'urée par l'action de l'hypermanganate de potasse sur les matières albuminoïdes. *C. R.*, 1870, **70**, 866.
56. Loew O. — Uber die Oxydation der Albuminate zu Harnstoff. *J. für Prakt. Chem.*, 1870 (N. F.), **2**, 289.
57. Kolbe H. — Chemische Ungebühr und Unsitte. *J. für Prakt. Chem.*, 1871 (N. F.), **4**, 399.
58. Ritter E. — Sur la transformation des matières albuminoïdes en urée. *Bull. Soc. Chim.*, 1871, 2, **16**, 32.
59. Béchamp A. — Mémoire sur les matières albuminoïdes. Mémoires présentés par divers savants à l'Académie des Sciences, 1884, **28**, n° 3, p. 380.
60. Lossen F. — Guanidine, ein Oxydationsprodukt des Eiweisses. Beitrag zur Frage der Harnstoffbildung. *Liebig's Ann.*, 1880, **201**, 369.
61. Pommerenig E. — Uber guanidinzersetzung im Tierkörper. *Hoffmeister's Beitr.*, 1901-1902, **1**, 561.
62. Benech E. et Kutscher F. — Die Oxydationsprodukte des Arginin. *Ztschr. für Physiol. Chem.*, 1901, **3**, 278.
63. Zickgraf G. — Die Oxydation des Leims mit Permanganaten. *Ztschr. für Physiol. Chem.*, 1904, **41**, 253.
64. Otori S. — Die Oxydation des pseudomucins und caseins mit Calciumpermanganate. *Ztschr. für Physiol. Chem.*, 1904-1905, **43**, 86.
65. Orglmeister G. — Uber die Bestimmung des Arginin mit Permanganat *Hoffmeister's Beitr.*, 1906, **7**, 21.

MÉTHODE DE SAKAGUCHI

Les dérivés de la guanidine donnent une coloration caractéristique lorsqu'ils sont traités par l'hypochlorite de sodium et le naphtol α. Cette réaction a été observée par SAKAGUCHI [66] qui étudie spécialement l'arginine ou acide guanido-aminovalérique. Il estime que la coloration est proportionnelle à la quantité d'arginine mise en réaction et décrit un dosage colorimétrique.

Ce dosage est modifié par WEBER [67] qui recherche l'obtention d'une coloration rapide et stable ; il rejette l'hypochlorite de sodium qui ne réagit qu'après un temps assez long et préconise l'hypobromite de sodium dont l'excès est détruit par addition d'urée.

Technique de Weber :

La technique de SAKAGUCHI à l'hypochlorite de sodium étant abandonnée, nous n'exposerons que la technique de WEBER reprise par JORPES et THOREN [68] et par Mlle JEAN [69] :

A 5 cm³ de solution d'arginine, on ajoute 1 cm³ de soude à 10 %, puis 1 cm³ de naphtol α à 0,02 %. Après 15 minutes de contact, on verse 1 cm³ d'hypobromite de sodium, puis, au bout de 5 à 6 secondes pour WEBER, 15 secondes pour JORPES et THOREN, 1 cm³ de solution d'urée à 40 %. Après 5 minutes de contact, on dose colorimétriquement par rapport à une solution titrée d'arginine.

Les réactions doivent être effectuées dans la glace avec des réactifs glacés.

Suivant au photomètre la marche de la réaction. JORPES et THOREN [68] décrivent ainsi les variations de l'intensité :

Après affusion de l'hypobromite, la coloration croît pendant 10 secondes, reste stable 10 secondes, puis décroît ensuite.

Critiques de la méthode.

Les critiques de la méthode portent sur deux points : sensibilité et non spécificité.

1° *Sensibilité* : La méthode est exacte à 1-2 % près, d'après Jorpes et Thoren, en opérant sur 5 cm³ de solution de taux compris entre 0,8 mgr. et 1,4 mgr. %.

Pour Mlle Jean, la précision serait de 3-4 % pour 5 cm³ de solution de taux compris entre 0,2 mgr. et 0,8 mgr. %.

En opérant en solution pure avec un étalon à 20 mgr. %, nous avons obtenu les résultats suivants :

Arginine en réaction mgr.	Arginine dosée mgr.	Erreur %
0,60	0,57	— 5
0,70	0,74	+ 5,7
0,80	0,77	— 3,7
0,90	0,92	+ 2,2
1	1	0
1,10	1,08	— 1,9
1,30	1,14	— 12,3
1,50	1,14	— 24
1,80	1,30	— 27,7

En prenant une prise d'essai comprise entre 0,8 et 1,1 mgr. dans 5 cm³ (16 à 22 mgr. %), les résultats sont satisfaisants.

Nos résultats et ceux des auteurs précités ne sont contradictoires qu'en apparence. L'intensité de la réaction n'est proportionnelle à la quantité d'arginine mise en réaction que pour des valeurs très voisines de l'étalon utilisé. Les colorations obtenues avec des prises d'essai de 0,02 mgr. d'arginine et de 1 mgr. d'arginine ne sont peut-être pas de la même nuance de ton, mais leurs intensités ne présentent pas une grosse différence.

Aussi, Furth et Deutschberger [70] peuvent-ils conclure que la pratique de cette méthode exige la connaissance préalable du résultat à obtenir ou du moins d'un ordre de grandeur très proche.

2° *Non spécificité* : De nombreuses substances peuvent intervenir pour fausser la réaction : l'azote ammoniacal à partir de 0,03 mgr., soit 6 mgr. %, l'histidine à partir de 0,41 %, soit 8,2 mgr. %, la tyrosine et le tryptophane à partir de 0,3 mgr., soit 6 mgr. %.

D'autre part Poller [71] avait montré que la monométhylguanidine, la diméthylguanidine, la triméthylguanidine, etc., donnent la réaction.

Aussi certains auteurs conseillent d'isoler l'arginine au préalable, en particulier par l'acide phosphotungstique.

Conclusions.

L'emploi de cette méthode doit être envisagé avec beaucoup de prudence. Elle peut être utile pour des dosages en série sur des corps dont on connaît à peu près exactement la teneur en arginine. L'erreur est inférieure à 4 % si on opère en solution très diluées selon la technique de Mlle Jean afin d'éliminer les substances parasites, avec un étalon de taux très voisin de celui de la solution à doser et en opérant sur une dizaine d'échantillons [69], les colorations jaunes accidentelles se présentant assez fréquemment.

BIBLIOGRAPHIE

66. Sakaguchi Shoyo. — Arginine free protein. *J. Biochem. Japan*, 1925 5, 143.
67. Weber C. J. — A modification of Sakaguchi's reaction for the quantitative determination of arginine. *J. of biol. Chem.*, 1930, **86**, 217.
68. Jorpes E. and Thoren S. — The use of the Sakaguchi reaction for the quantitative determination of arginine. *Biochem. J.*, 1932, **26**, 1504.
69. Jean Mlle G. — Sur les microdosages colorimétriques de l'arginine en solution pure et dans les hydrolysats protéiques. *Bull. Soc. Ch. biol.*, 1934, **16**, 307.
70. Furth O. und Deutschberger O. — Uber den Argininge halt einiger Proteine some normaler und amyloidhaltiger Organe. *Bioch. Ztschr.*, 1927, **186**, 139.
71. Poller K. — Uber die Farbenreaktion von Sakaguchi. *Bioch. Ztschr.*, 1927, **59**, 1226.

MÉTHODE DE LANG

Harden [72], ayant remarqué que certaines bactéries donnent avec le diacétyle en milieu alcalin une coloration violette, recherche les corps susceptibles de donner cette réaction. En collaboration avec Norris [73], il isole par la méthode de Weiss [23] un seul acide aminé capable de réagir dans ces conditions : c'est l'arginine.

La réaction est commune à tous les corps présentant la fonction $NH = \underset{\underset{NH^2}{|}}{C} - NH - R$, c'est-à-dire aux dérivés de la guanidine possédant une fonction NH^2 libre.

Lang [74], reprenant la question, a basé sur cette réaction le dosage suivant en substituant l'acétylbenzoyle au diacétyl.

Les hydrolysats sont purifiés par agitation avec du kaolin, puis centrifugés. Le centrifugat clair est traité par la potasse à 60 % et par une solution alcoolique fraîche d'acétylbenzoyle. On porte 15 minutes au bain-marie bouillant. La solution refroidie immédiatement est traitée par le chlorhydrate d'hydroxylamine qui élimine l'excès d'acétylbenzoyle. Après 30 minutes, on compare à une solution d'arginine traitée de même ou on fait la lecture au photomètre.

La solution a une coloration propre qui doit être compensée en ajoutant de la solution à analyser à la solution standard.

Le dosage n'est plus exact au-dessus de 0,9 mgr. d'arginine et il n'y a plus de coloration au-dessous de 0,2 mgr.

Ce dosage n'a pas donné satisfaction à Mlle Jean [69] qui n'a pas obtenu des teintes comparables dans une série d'échantillons contenant 1 mgr. d'arginine. La réaction n'est proportionnelle que pour une marge très faible et Lang lui-même ne donne des résultats en solutions pures que pour des prises d'essai comprises entre 0,9 mgr. et 1,2 mgr. avec des erreurs inférieures à 4 %.

Conclusions.

La méthode de Lang n'est pas assez précise pour permettre un dosage exact de l'arginine.

BIBLIOGRAPHIE

23. Weiss P. — Untersuchungen über die Bildung des Laschsprotamins. *Ztschr. für Physiol. Chem.*, 1907, **52**, 107.

69. Jean Mlle G. — Sur les microdosages colorimétriques de l'arginine en solution pure et dans les hydrolysats protéiques. *Bull. Soc. Ch. biol.*, 1934, **16**, 307.

72. Harden A. — On Voges and Proskauer's Reaction for certain bacteria. *Proced. of the Royal Soc. of Lond.*, B., 1905, **77**, 424.

73. Harden A. et Norris O. — The diacetylreaction for proteins. *J. of Physiol.*, 1911, **42**, 332.

74. Lang K. — Uber den Mechanismus der Diacetylreaktion von Guanidin ihre Umformung und Anwendung zur kolorimetrischen Bestimmung von Kreatinin und Arginin. *Ztschr. für Physiol. Chem.* 1934, **208**, 273.

MÉTHODE DE VAN SLYKE A LA SOUDE

Par ébullition de l'arginine avec l'eau de baryte saturée, Schulze et Likiernik [75] décrivent la formation d'urée et la formation d'ammoniaque et de gaz carbonique quand la réaction est effectuée sous pression.

Osborne, Leavenworth et Brautlecht [24], faisant agir sur l'arginine de la soude $N/10$, remarquent que l'arginine se décompose peu à peu en dégageant de l'ammoniaque et que la décomposition est terminée quand il s'est dégagé sous forme d'ammoniaque environ 50 % de l'azote mis en réaction sous forme d'arginine. Van Slyke [12], dans sa méthode de dosage des acides aminés, évalue directement l'arginine par ébullition avec la potasse à 50 % pendant 6 heures. Dans ces conditions il estime que l'azote ammoniacal dégagé représente la moitié de l'azote de l'arginine en solution.

Plimmer [76] remarque que l'arginine ne dégage pas entièrement la moitié de son azote et que l'histidine est légèrement décomposée (1, 5-3 %). La cystine dégage bien de l'ammoniaque, mais sa teneur est trop faible pour influencer les résultats, sauf pour les kératines. Il propose de ramener de 50 à 20 % le titre en soude de la solution où l'arginine est décomposée.

La méthode est utilisée couramment par certains auteurs et il nous a paru intéressant de confirmer la décomposition de l'arginine et la stabilité de l'histidine dans ces conditions.

Etude de l'arginine.

49 mgr. d'arginine en solution dans 50 cm³ d'eau sont traités par 10 gr. de soude caustique. La solution est portée à l'ébullition à reflux pendant 6 heures. L'ammoniaque est chassée par ébullition, puis l'azote total de la solution est dosée par la méthode de Kjeldahl.

Arginine pesée mgr.	Arginine en solution dosée mgr.	Arginine en solution calculée mgr.
93	49	46,5

La même opération est effectuée avec 20 gr. de soude.

Arginine pesée mgr.	Arginine en solution dosée mgr.	Arginine en solution calculée mgr.
340	178	170

Etude de l'histidine.

L'histidine a été traitée dans les mêmes conditions que l'arginine avec de la soude à 40 %.

Histidine pesée mgr.	Histidine en solution mgr.
422	417

Etude d'un mélange arginine + histidine

Un mélange arginine + histidine a été traité dans les mêmes conditions que l'arginine avec de la soude à 40 %.

Solution à étudier		Résultats calculés			
N arginine pesée mgr.	*N* histidine pesée mgr.	*N* arginine mgr.	*N* histidine mgr.	*N* total mgr.	*N* total dosé mgr.
38,4	36,4	19,2	36,4	55,6	57

Conclusion.

Nous avons montré qu'en solutions pures, l'arginine peut être dosée à 5 % près par la méthode de Van Slyke à la soude ; l'histidine n'est pas un élément perturbateur. Pour appliquer cette méthode aux hydrolysats de protéides, il convient de vérifier par une méthode spécifique précise (méthode à l'arginase) (1) si le milieu considéré ne contient pas de corps susceptibles de dégager de l'ammoniaque dans les conditions du dosage.

---

1. Voir page 55.

BIBLIOGRAPHIE

12. Van Slyke D. D. — The analysis of proteins by determination of the chemical group characteristic of the different amino-acids. *J. of biol. Chem.*, 1911-1912, **10**, 15.
24. Osborne T. B., Leavenworth C. S. et Brautlecht C. A. — The different forms of nitrogen in proteins. *Am. J. Physiol.*, 1908, **23**, 180.
75. Schulze E. und Likiernick. — Uber die Bildung von Harnstoff bei der Spaltung des Arginins. *Ber.*, 1891, **24**, 2701.
76. Plimmer R. H. A. — The analysis of proteins. I. The estimation of arginin by decomposition with alcali. *Biochem. J.*, 1916, **10**, 115.

MÉTHODE DE BERGMANN ET ZERVAS

A la suite des travaux préliminaires de Hugo SCHIFF [77 à 81], de GERNGROSS [82], de SCHEIBLER et BAUMGARTEN [83], de GERNGROSS et ZUHLKE [84], BERGMANN, ENSSLIN et ZERVAS [85] préparent les sels métalliques ou les sels d'alcaloïdes de nombreux amino-acides en présence d'aldéhydes.

La condensation de l'aldéhyde et de l'amino-acide s'effectue très simplement suivant la réaction :

$$R-CH\boxed{O+H^2}N-\underset{\underset{R'}{|}}{CH}-COOH \rightarrow R-CH=N-\underset{\underset{R'}{|}}{CH}-COOH$$

Le métal, d'autre part, se fixe sur la fonction acide.

En milieu alcalin l'arginine seule réagit tout différemment : l'arginine et l'aldéhyde se combinent de façon à donner un composé insoluble incapable de réagir avec les métaux, ayant perdu tout caractère acide et dont la formule n'est pas encore déterminée [86]. La lysine donne partiellement la réaction en milieu neutre mais non en milieu alcalin. BERGMANN et ZERVAS ont essayé de doser l'arginine dans les hydrolysats en préparant ce composé et en le pesant. Leurs résultats n'ont pas été heureux, la réaction n'étant pas complète.

On peut penser que bien que la réaction ne paraisse pas quantitative si on pèse le composé formé, l'arginine se combine pourtant totalement avec l'aldéhyde. Dans ce cas il serait possible d'imaginer un dosage basé sur la disparition de la fonction acide de l'arginine. C'est ce qui nous a conduit à rechercher si la combinaison de l'arginine avec les aldéhydes benzoïque, salicylique et la vanilline était complète.

1° Aldéhyde benzoique.

a) *A froid* : 81 mgr. d'arginine sont dissous dans 10 cm³ d'eau, puis traités par 1 cm³ d'aldéhyde benzoïque en solution dans 20 cm³ d'alcool à 90°. La solution est alcalinisée à la baryte en présence de phénolphtaléine et abandonnée 48 heures à la glacière. Un précipité s'est formé qui est éliminé par filtration. L'azote est dosé dans le filtrat par la méthode de Kjeldahl. Arginine en solution : 56,7 mgr.

b) *à chaud* : 81 mgr. d'arginine sont dissous dans 10 cm³ d'eau et traités par 1 cm³ d'aldéhyde benzoïque en solution dans 20 cm³ d'alcool à 90°. La solution est alcalinisée par la baryte en présence de phénolphtaléine, puis soumise à l'ébullition à reflux pendant 30 minutes.

Après 24 heures de repos on filtre et l'azote est dosé dans le filtrat.

Arginine en solution = 58,5 mgr.

Le filtrat est traité par la pâte à l'acétate d'argent (1). Après deux heures de contact on alcalinise par la baryte et on filtre. L'argent est éliminé dans le filtrat par l'hydrogène sulfuré en milieu acétique et l'azote est dosé par la méthode de Kjeldahl.

Arginine = 17,6 mgr.

2° Aldéhyde salicylique.

a) *à froid* : 40 mgr. d'arginine sont dissous dans 5 cm³ d'eau puis traités par 1 cm³ d'aldéhyde salicylique en solution dans 20 cm³ d'alcool à 90°. La solution est alcalinisée par la baryte en présence de tournesol (la phtaléine ne pouvant être utilisée en présence d'aldéhyde salicylique) et abandonnée 24 heures à la glacière. Un précipité s'est formé qui est éliminé par filtration. L'azote est dosé dans le filtrat par la méthode de Kjeldahl.

Arginine en solution = 28 mgr.

Le filtrat est traité par la pâte à l'acétate d'argent et après deux heures de contact alcalinisé fortement par la baryte en présence de tournesol. On filtre. L'argent est éliminé dans le filtrat par l'hy-

---

1. Voir p. 77.

drogène sulfuré en milieu acétique et l'azote dosé par la méthode de KJELDAHL.

Arginine = 2 mgr. ;

b) *à chaud* : 40 mgr. d'arginine sont dissous dans 5 cm³ d'eau puis traités par 1 cm³ d'aldéhyde salicylique en solution dans 20 cm³ d'alcool à 90°. La solution est alcalinisée par la baryte en présence de tournesol, portée à l'ébullition à reflux pendant 30 minutes, puis abandonnée au repos pendant 24 heures. Un précipité s'est formé qui est éliminé par filtration. L'azote est dosé dans le filtrat par la méthode de KJELDAHL.

Arginine en solution = 28,7 mgr.

Le filtrat est traité par la pâte à l'acétate d'argent et après deux heures de contact on alcalinise fortement par la baryte en présence de tournesol et on filtre. L'argent est éliminé par l'hydrogène sulfuré en milieu acétique. L'azote est dosé par la méthode de KJELDAHL.

Arginine = 2,5 mgr.

3° VANILLINE.

a) *à froid* : 42 mgr. d'arginine sont dissous dans 5 cm³ d'eau puis traités par 50 cgr. de vanilline en solution dans 25 cm³ d'alcoo à 90°. La solution est alcalinisée par la baryte en présence de tour nesol et abandonnée à la glacière pendant 24 heures. Il ne se forme pas de précipité. La solution est traitée par la pâte à l'acétate d'argent. Après deux heures de contact, la solution est alcalinisée fortement par la baryte puis filtrée. L'azote est dosé dans le précipité par la méthode de KJELDAHL après élimination de l'argent par l'hydrogène sulfuré en milieu acétique.

Arginine = 5,2 mgr. ;

b) *à chaud* : 42 mgr. d'arginine sont dissous dans 5 cm³ d'eau, puis traités par 50 cgr. de vanilline en solution dans 25 cm³ d'alcool à 90°. La solution est alcalinisée par la baryte en présence de tournesol, puis soumise à l'ébullition à reflux pendant 30 minutes. Après 24 heures de repos il ne s'est pas formé de précipité.

La solution est traitée par la pâte à l'acétate d'argent. Après deux heures de contact, la solution est alcalinisée fortement par la baryte puis filtrée. L'azote est dosé dans le filtrat par la méthode

de Kjeldahl après élimination de l'argent par l'hydrogène sulfuré en milieu acétique.

Arginine = 4,9 mgr.

Les résultats peuvent être réunis dans le tableau suivant, en remarquant que l'arginine précipitée par l'acétate d'argent en milieu alcalin représente la fraction non combinée à l'aldéhyde et gardant son caractère acide :

		Arginine traitée par			
		Aldéhyde en milieu alcalin		Acétate d'argent en milieu alcalin	
	Arginine pesée mgr.	précipitée mgr.	en solution mgr.	précipitée mgr.	en solution mgr.
Aldéhyde benzoïque :					
Réaction à froid	81	24,3	56,7		
Réaction à chaud	81	22,5	58,5	40,9	17,6
Aldéhyde salicylique :					
Réaction à froid	40	22	28	26	2
Réaction à chaud	40	21,3	28,7	25,5	2,5
Vanilline :					
Réaction à froid	42	0	42	5,2	36,8
Réaction à chaud	42	0	42	4,9	37,3

Nous avons vérifié que l'arginine forme avec les aldéhydes benzoïque et salicylique un complexe insoluble en milieu alcalin et que la réaction n'est pas complète. L'arginine entrée dans le complexe perd tout caractère acide et nous avons mis en évidence l'arginine libre des eaux-mères par son action acide vis-à-vis de l'argent.

Nous avons traité l'arginine par la vanilline en milieu alcalin, nous avons constaté l'absence de précipité et la disparition de l'acidité de l'arginine vis-à-vis de l'argent pour une forte proportion (80-85 %).

Les réactions observées ne sont pas suffisamment complètes pour permettre d'établir un dosage de l'arginine basé sur la condensation de l'arginine et des aldéhydes aromatiques en milieu alcalin, soit par pesée du complexe formé s'il est insoluble, soit par dosage de l'acidité disparue au cours de la réaction.

BIBLIOGRAPHIE

77. Schiff Hugo. — Ueber alkylensubstituirte Amidosäuren. *Liebig's Annal*, 1881, **210**, 114.

78. Schiff Hugo. — Ueber methylenasparagine. *Liebig's Annal*, 1899-1900, **310**, 25.

79. Schiff Hugo. — Trennung von Amin-und Säurefunction in Lösungen von aminosäuren mittelst Formaldehyd. *Liebig's Annal*, 1901, **319**, 59.

80. Schiff Hugo. — Trennung von Amin-und Säurefunction in Losungen von Eiweisskörpern. *Liebig's Annal*, 1901, **319**, 287..

81. Schiff Hugo. — Trennung von Amin-und Säurefunction mittelst Formaldehyd. *Liebig's Annal*, 1902, **325**, 348.

82. Gerngross O. — Die Fähigkeit der tierischen Haut zur Reaktion mit Phenolaldehyden. *Bioch. Ztschr.*, 1920, **108**, 82.

83. Scheibler H. und Baumgarten P. — Ueber eine Synthese von N-Alkyl-aminosäurendurch Hydrierung. *Ber.*, 1922, **55**, 1358.

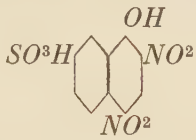
84. Gerngross O. und Zuhlke E. — Ueber eine einfache Synthese von N-Benzyliden-Aminosauren Salzen. *Ber.*, 1925, **57**, 1482.

85. Bergmann M., Ensslin H. und L. Zervas. — Ueber die Aldehyd Verbindungen der Aminosäuren. *Ber.*, 1925, **58**, 1034.

86. Bergmann M. und Zervas. — Ueber die Aldehydverbindungen der Aminosäuren und ihre präparative Verwendung. *Ztschr. für Physiol. Chem.*, 1926, **152**, 282.

MÉTHODE DE KOSSEL ET GROSS

En 1924 Kossel et Gross [87], étudiant l'action de l'acide flavianique ou acide 1 naphtol - 2 - 4 - dinitro 7 sulfonique



sur différents acides aminés, remarquent l'insolubilité du sel donné par l'arginine et établissent une méthode de dosage très simple : L'hydrolysat de protéides privé d'acide sulfurique par la baryte est traité par une solution d'acide flavianique. Après trois jours de repos à la glacière, on recueille les cristaux et on pèse. Vickery et Leavenworth [30] ont appliqué la méthode à la fraction « arginine », dans la méthode argentique de dosage des acides diaminés. Cahn et Bonot [33] n'ont pas obtenu d'aussi bons résultats que les auteurs précédents et parfois n'ont pu amorcer la précipitation dans des milieux contenant de l'arginine.

Furth et Deutschberger [70] conseillent au préalable d'isoler l'arginine à l'état de phosphotungstate, ce qui entraîne des erreurs dues à la solubilité de ce composé.

Conclusion.

La précipitation de l'arginine par l'acide flavianique est excellente en solution pure. Nous l'avons vérifié. Par contre, sur des hydrolysats, il se peut que certains acides aminés empêchent ou gênent la précipitation. Les résultats obtenus par isolement préalable de l'arginine deviennent fonction de la méthode de fractionnement utilisée.

BIBLIOGRAPHIE

30. Vickery H. B. and Leavenworth C. S. — Modifications for the determination of the basic amino-acids of proteins. The bases of edestin. *J. of Biol. Chem.*, 1928, **76**, 707.

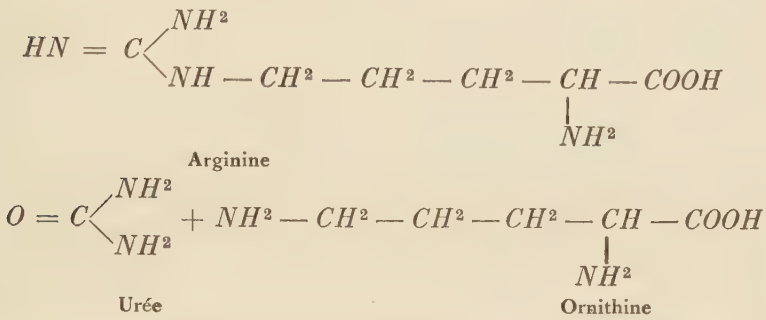
33. Cahn Th. et Bonot A. — Recherches sur les variations des équilibres des constituants cellulaires. IV. Techniques. *Ann. Physio et Physico Ch. Biol.*, 1928, **4**, 822.

70. Furth O. and Deutschberger O. — Uber den Argininghalt einiger. Proteine sowie normaler und Amyloidhaltiger Organe. *Bioch. Ztschr.*, 1927, **186**, 139.

87. Kossel A. und Gross R. E. — Uber die Darstellung und quantitative Bestimmung des Arginins. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1924, **135**, 167.

MÉTHODE DE JANSEN

La décomposition de l'arginine en ornithine et urée :



peut être effectuée soit par des organismes vivants comme l'*Aspergillus* Niger, soit par un ferment, l'arginase, qui se trouve principalement dans le foie.

La méthode d'Iwanoff [88] consiste à ensemencer l'hydrolysat étudié par l'*Aspergillus Niger*, puis à doser l'urée formée par la la méthode de Fosse [89] au xanthydrol. Cette méthode ne peut être considérée jusqu'ici que comme qualitative.

Jansen [90] a proposé en 1916 une méthode de dosage de l'arginine en combinant l'action de deux ferments : l'arginine est décomposée en ornithine et urée selon la méthode de Kossel et Dakin [91], puis l'urée est décomposée en gaz carbonique et ammoniac par l'uréase selon la méthode de Marshall [92].

D'après Cahn et Bonot [33], la technique est passible de plusieurs objections :

1° Jansen fait agir simultanément l'arginase et l'uréase alors que leur *pH* optima est différent.

2° La durée d'action de l'arginase (24 heures à 15°) est trop courte ; Eldbacher et Bonem [93] l'ont fixée à 72 heures à 37°.

3° Le dosage de l'urée sous forme d'ammoniac est à critiquer, ce composé pouvant avoir de multiples origines.

Hunter et Dauphinee [94] emploient la méthode de Jansen après avoir fait passer l'arginine à l'état de phosphotungstate, ce qui entraîne une correction pour la solubilité du phosphotungstate et l'obligation de tamponner la solution dans laquelle doit agir l'arginase.

Dauphinee et Hunter [95] étudient selon leur méthode la libération d'urée à partir de différents protéides sous l'action de l'arginase. Tous les protéides expérimentés libèrent une quantité d'urée correspondant à la totalité de l'arginine qu'ils contiennent, mais dans des temps très variables.

La décomposition de l'arginine s'amorce en 3 heures et est complète en 14 jours pour la gélatine, elle ne s'amorce qu'en 2-3 jours et n'est complète qu'en 22 jours pour l'albumine d'œuf.

Or, Cahn et Bonot [33] ont vérifié que l'arginine était intégralement décomposée en 72 heures à 37°. L'insuccès relatif de Hunter et Dauphinee tient à ce qu'ils n'ont pas ajusté leur *pH* à 9,9 (*pH* optimum de l'arginase) et surtout n'ont pas tamponné leurs milieux. Dans ces conditions l'arginase agit très lentement.

La technique à suivre est celle de Cahn et Bonot [6] que nous résumons rapidement :

1. Hydrolyse des protéides par ébullition avec l'acide chlorhydrique à 25 % pendant 48 heures.

Elimination de l'acide chlorhydrique par évaporation à sec et décoloration au noir animal.

2. Ajustement du milieu à $pH = 9,9$ (colorimétriquement) et tamponnage à l'aide de glycocolle.

3. Action d'une poudre fermentaire d'arginase titrée pendant 72 heures à 37° sous toluène.

4. Dosage de l'urée par la méthode de Fosse au xanthydrol. La poudre fermentaire est obtenue en précipitant par l'acétone un jus provenant de l'expression d'un foie de Chien. La poudre est titrée à l'aide de carbonate d'arginine pur.

Ce dosage a permis aux auteurs de retrouver 99,7 % de la quantité d'arginine ajoutée à un hydrolysat.

Conclusions.

Cette méthode sur des solutions pures est remarquable et l'erreur sur des hydrolysats ne dépasse pas 2 %. Elle est à l'heure actuelle,

grâce à sa spécificité et son exactitude, la meilleure des méthodes de dosage utilisées dans la chimie des acides aminés.

BIBLIOGRAPHIE

33. Cahn Th. et Bonot A. — Recherches sur les variations des équilibres des constituants cellulaires. IV. Techniques. *Ann. Physiol. et Physico. Ch. Biol.*, 1928, **4**, 822.
88. Iwanoff N. N. — Der Harnstoff der Pilze und dessen Bedeutung. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1927, **170**, 274.
89. Fosse R. — L'urée, 303 pages. Paris, 1928. Les Presses Universitaires de France.
90. Jansen B. C. P. — Ein Verfahren zur genauen quantitativen Arginin Bestimmung in Eiweissarten. *Chem. Weekbl.*, 1917, **14**, 124.
91. Kossel A. und Dakin H. D. — Uber die Arginase. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1904, **41**, 321.
92. Marshall E. K. — A rapid chimical method for the estimation of urea in urine. *J. of biol. Chem.*, 1913, **14**, 283.
93. Eldbacher S. und Bonem P. — Beiträge zur Kenntniss der Arginase. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1925, **145**, 69.
94. Hunter K. and Dauphinee J. — The determination of arginin by the use of arginase. *J. of biol. Chem.*, 1925, **63**, 39.
95. Dauphinee J. A. and Hunter A. — The rate of liberation of arginine in tryptic digestion. *Biochem. J.*, 1930, **24**, 1128.

RÉSUMÉ

Les méthodes de dosage direct de l'arginine ont été exposées successivement et l'étude critique des techniques discutées a été entreprise.

Nous en concluons que, seule, la méthode de Jansen modifiée par Cahn et Bonot, véritablement spécifique, permet de doser l'arginine à 2 % près dans des hydrolysats de protéides. Les méthodes de Van Slyke et de Sakaguchi donnent des résultats à 10 % près, mais il faut vérifier par la méthode de Jansen si d'autres corps n'interviennent pas et de plus pour la méthode de Sakaguchi, il faut connaître l'ordre de grandeur des résultats à obtenir.

III

Etude critique des méthodes directes de dosage de l'histidine.

MÉTHODE DE KOBER ET SUGIURA

En faisant agir à froid en solution neutre ou faiblement alcaline un amino-acide sur l'hydroxyde de cuivre, Kober et Sugiura [96] obtiennent la formation d'un complexe. La solution filtrée et évaporée abandonne un résidu cristallisé, complexe du cuivre et de l'amino-acide. La teneur en cuivre de ce composé qui contient tout l'amino-acide mis en réaction, peut, après acidification, être estimée à l'iode. Un coefficient convenable permet d'en déduire l'amino-acide.

L'année suivante [97], ces auteurs remarquent que tous les sels de cuivre des amino-acides, sauf l'histidine, sont précipités par l'acide amino-caproïque normal et la phénylglycine. Le cuivre de la liqueur de Fehling lui-même est précipité dans ces conditions.

Le dosage est dès lors très simple :

Les hydrolysats neutralisés sont traités par l'hydroxyde de cuivre. La solution est filtrée puis traitée par une solution d'acide amino-caproïque normal. Le précipité formé est recueilli, lavé à l'eau bouillante. Les liqueurs de filtration sont concentrées dans le vide et le cuivre y est dosé par l'iode.

Cette méthode très simple ne doit pas être très fidèle, car les auteurs qui annoncent un prochain travail sur la question, n'ont, à notre connaissance, nullement complété leurs premières expériences. D'autre part, Onslow [98] n'a pas pu obtenir de bons résultats sur de l'histidine pure. Il ne nous a pas semblé utile de procéder à de nouvelles vérifications et nous ne conseillons pas l'emploi de cette méthode.

BIBLIOGRAPHIE

96. Kober P. A. et Suguira K. — The copper complexes of amino-acides, peptides and peptones. *J. of biol. Chem.*, 1912-1913, **13**, 1.

97. Kober P. A. et Sugiura K. — A micro-chemical method for the determination of α and β-amino-acids and certain derivates ; in proteolysis, blood and urin. *Ann. J. Physiol.*, 1913, **35**, 1546.

98. Onslow H. — A method of estimating the tryptophan content of caseinogen, based on determinations of the nitrogen values of the mercuric, sulphate precipitate. *Bioch. J.*, 1924, **18**, 63.

MÉTHODES DE DIAZOTATION

La présence d'un noyau imidazol permet à l'histidine de copuler avec les diazoïques.

Les méthodes basées sur cette propriété sont de deux types :

1° Méthodes volumétriques ;

2° Méthodes colorimétriques.

Méthodes volumétriques.

Il existe trois méthodes volumétriques exposées par LAUTENSCHLAGER [99] :

1° Procédé aux sels d'argent ;

2° Titrage direct ;

3° Procédé au titane.

1° PROCÉDÉ AUX SELS D'ARGENT.

A une solution d'histidine on ajoute une solution titrée de nitrate d'argent jusqu'à ce que la solution étudiée ne donne plus de coloration rouge avec une solution alcaline d'acide *p*-diazobenzolsulfonique.

On opère à la touche.

Une molécule d'imidazol correspond à un atome d'argent, une molécule d'histidine à 2 atomes d'argent. Cette méthode ne peut être employée en présence des nombreux autres corps qui donnent aussi la réaction (guanine, adénine, théophylline, etc...).

2° TITRAGE DIRECT.

On traite la solution d'histidine par la solution de diazoïque. Le dosage se fait à la touche avec un corps donnant avec le diazoïque

une coloration plus foncée que l'histidine. Les résultats ne sont pas bons.

3° Procédé au titane.

Il est basé sur la méthode de Knecht et Hibbert [100].

La solution d'histidine est traitée par une solution d'acide *p*-diazobenzolsulfonique dont l'excès est décomposé par l'alcool à l'ébullition. Le colorant formé avec l'histidine reste intact, il est déterminé par oxydation du trichlorure de titane ou du tétrachlorure de titane à l'ébullition.

De la quantité de titane oxydé on calcule le diazoïque et par suite l'histidine, tous se correspondent molécule à molécule.

La tyrosine est dosée elle aussi dans l'opération et la présence d'autres acides aminés empêchent la copulation convenable de l'histidine.

L'auteur essaie de se soustraire à l'action de ces derniers soit en les dénaturant par benzoylation ou cyclysation, ou mieux en isolant au préalable l'histidine par les méthodes argentiques ou mercurielles.

Conclusions.

Les méthodes volumétriques satisfaisantes sur les solutions d'histidine pure deviennent fonction des méthodes de séparation préalable quand on veut les appliquer aux hydrolysats.

Méthodes colorimétriques.

La diazotation du noyau imidazol par l'acide diazobenzènesulfonique donne une coloration jaune en milieu ammoniacal, une coloration orangée en milieu sodique. Cette réaction, décrite par Ehrlich, a été appliquée par Pauly [101 et 102] à la chimie des protéides, mais ce sont Weiss et Ssobolew [103] qui, les premiers, en font la base d'un dosage volumétrique de l'histidine ou imidazolalanine qui réagit tant par son noyau imidazol que par sa fonction amine.

A 10 cm³ d'une solution d'histidine à 0,01 %, on ajoute successivement 1,5 cm³ de réactif diazoïque, puis 3 cm³ d'une solution de carbonate de sodium à 10 %.

Koessler et Hanke [104] effectuent la réaction selon la technique suivante : 5 cm³ de solution de carbonate de sodium à 1,1 % sont versés dans une cuve colorimétrique. On ajoute alors 2 cm³ de réactif diazoïque et, 30 secondes après mélange, 1 cm³ de solution d'histidine à 0,01 gr. %. Au bout de 5 à 6 minutes, la coloration est maxima et se maintient durant 3 minutes. On compare avec une solution hydroalcoolique de rouge congo (0,01 gr. °/oo) et de méthyl-orange (0,0022 gr. °/oo). Koessler et Hanke inversent l'ordre d'entrée en action des réactifs car ils supposent que la copulation est effectuée par un diazohydrate :

$$NaO - SO^2 - C^6H^4 - N = N - OH$$

ou par la nitrosamine isomère :

$$NaO - SO^2 - C^6H^4 - NH - N = O$$

Il convient donc de former le réactif avant de le mettre en présence du noyau imidazol.

Les auteurs appliquent leur méthode au dosage de l'histidine dans la caséine après isolement par l'acide phosphotungstique.

Jorpes (105) reprend la question en suivant au photomètre la marche de la réaction selon les techniques de Koessler et Hanke, puis de Weiss et Ssobolew.

1° Technique de Koessler et Hanke.

Au début une couleur jaune apparaît qui fait place, après 2 à 3 minutes, à une couleur rouge. L'intensité de la coloration est maxima 3 minutes à 3 minutes 30 secondes après avoir mélangé les réactifs et ne reste constante que 2 à 3 minutes. Il est d'ailleurs indifférent d'ajouter l'histidine au réactif diazotant 2 minutes après sa formation ou 30 secondes après comme l'indiquent les auteurs. La technique est à rejeter, car elle donne des résultats trop inconstants.

2° Technique de Weiss et Ssobolew.

La coloration est maxima 3 minutes 30 secondes à 4 minutes après le mélange des réactifs, puis se maintient 4 minutes. La concentration en alcali joue un rôle très important : l'emploi d'une solution de carbonate de soude à 10 % à la place de la solution à 1,1 % empêche le développement de la coloration.

Jorpes [105] conseille la technique suivante inspirée de Weiss et Ssobolew :

A 1 cm³ de solution neutre ou très faiblement acide d'histidine, on ajoute 2 cm³ de réactif diazoïque (1) puis, 1 à 3 heures après, 5 cm³ de solution de carbonate de sodium anhydre à 1,1 %. Au bout de 4 à 8 minutes, on fait la lecture au photomètre.

Furth et Majer [106] rejettent la méthode pour doser les dérivés imidazols de l'urine, comme entachée de trop d'erreurs dues à des réactions parasites ; ceci malgré les modifications de Hunter [107].

Discussion.

Les critiques faites à cette méthode sont de deux ordres :

1° Critiques de la réaction ;
2° Actions parasites de substances étrangères.

1° *Critiques de la réaction* :

La méthode, quelle que soit la technique utilisée, exige une grande exactitude dans les différentes phases de la réaction qui doivent être suivies au chronomètre. L'emploi d'une solution étalon est en conséquence impossible, puisqu'on ne peut exécuter deux opérations simultanées, et un étalon artificiel (Hanke et Koessler) ou un dosage photométrique s'imposent.

Enfin la réaction du milieu joue un rôle considérable et Jorpes lui assigne comme limites :

acidité ...0,01 *N* — alcalinité ..0,001 *N*.

Il est assez difficile de se maintenir dans ces limites si, ainsi que cet auteur le laisse prévoir, les sels neutres jouent un rôle défavorable au-dessus d'une certaine concentration.

---

1. Dans un ballon jaugé de 50 cm³ introduire successivement :

Acide sulfanilique	0,9 gr.
Acide chlorhydrique à 9 cm³ %	1,5 cm³
Nitrite de sodium à 5 %	1,5 cm³

Refroidir 5 minutes dans la glace et ajouter en agitant :

Nitrite de sodium à 5 %	6 cm³

Refroidir 6 minutes dans la glace et compléter à 50 cm³ avec de l'eau distillée (Koessler et Hanke).

2° *Actions parasites de substances étrangères.*

Tous les corps possèdent un noyau imidazol donnent une réaction de PAULY positive de même que la tyrosine, les phénols et les métaux lourds. Il existe même des composés encore inconnus qui interfèrent. Il faut donc extraire l'histidine du milieu où on la dose à l'état de sel d'argent par la baryte, à l'état de phosphotungstate dont la teneur dans la solution à doser ne devra pas dépasser 3 %, ou à l'état de sel mercurique (réactif d'HOPKINS) avec élimination ultérieure du mercure.

CONCLUSION.

La réaction de PAULY, appliquée au dosage colorimétrique de l'histidine, soit par la technique de WEISS et SSOBOLEW, soit par la technique de KOESSLER et HANKE, ne saurait être retenue. Les résultats obtenus subissent l'influence du mode d'extraction préalable utilisé, ils sont fonction de nombreux corps étrangers connus ou inconnus. La réaction est en elle-même si délicate qu'elle ne permet que difficilement l'usage d'un témoin préparé avec une solution d'histidine pure. L'emploi de ce dosage ne peut donc pas être conseillé.

BIBLIOGRAPHIE

99. LAUTENSCHLAGER C. L. — Uber die titrimetrische bestimmung des Histidins und anderer Imidazolderivate. *Ztsch. für Physiol. Chem.*, 1918, **102**, 226.
100. KNECHT E. und E. HIBBERT E. — Das Titantrichlorid in der volumetrischen Analyse. *Ber.*, 1903, **36**, II, 1549.
101. PAULY H. — Uber die Constitution des Histidins. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1904, **42**, 508.
102. PAULY H. — Uber die Einwirkung von Diazoniumverbindungen auf Imidazole. Erwindungan Herrn Burrian. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1905, **44**, 159.
103. WEISS M. und SSOBOLEW N. — Uber ein colorimetrisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Histidins. *Bioch. Ztschr.*, 1913-1914, **58**, 119.
104. KOESSLER K. K. und HANKE M. T. — *J. of biol. Chem.*, 1919, 37.
105. JORPES E. — The colorimetric estimation of histidin. *Biochem. J.*, 1932, **26**, 1507.
106. FURTH O. und MAJER E. H. — Uber das Auftreten von Imidazolderivaten im Harn. *Bioch. Ztschr.*, 1933, **264**, 142.
107. HUNTER G. — The diazoreaction in urine. *Bioch. J.*, 1925, **19**, 25.

MÉTHODES AU BROME

La présence d'un noyau imidazol qui renferme deux doubles liaisons permet à l'histidine de fixer le brome.

Deux catégories de dosage sont basées sur cette propriété :

1° Les méthodes qui établissent un « indice de brome » : PLIMMER et PHILIPPS ;

2° Les méthodes qui, après chauffage avec l'eau bromée, utilisent un dosage colorimétrique. La réaction type est celle de KNOOP.

Méthode de Plimmer et Philipps

Ces auteurs ont appliqué la méthode générale de bromuration de PLIMMER et EAVES [108] : l'amino-acide en solution chlorhydrique diluée est traité par un mélange de bromure et de bromate de sodium. Après 10 à 15 minutes de contact, l'excès de brome est estimé par déplacement de l'iode aux dépens d'iodure de potassium ajouté à la solution puis titrage de l'iode libre par l'hyposulfite de sodium.

Les auteurs [109] estiment que deux atomes de brome sont fixés par une molécule d'histidine, mais, dans leurs expériences, les résultats sont toujours un peu supérieurs à ceux prévus par cette théorie. Ils expliquent les différences observées par des erreurs de manipulation. L'arginine et la lysine sont sans influence sur le dosage ; par contre, la cystine, probablement oxydée par le brome, est une cause d'erreur si elle est en quantité assez importante.

PLIMMER et PHILIPPS ont appliqué leur méthode à un hydrolysat de gélatine : les bases hexoniques sont précipitées par l'acide phosphotungstique, le précipité est dissous par la soude et l'histidine dosée dans la solution. Une expérience témoin est faite avec addition d'histidine pure :

	N histidine % d'*N* total
Gélatine	6,7
Gélatine + 10,1 *N* histidine	14,4

La perte en histidine est de 16,8 — 14,4 = 1,7 pour 10,1, soit une erreur de 10,6 %.

Calvery [110] a montré l'influence de la température, de la concentration en acide chlorhydrique sur la réaction et insiste sur le fait que, dans un hydrolysat de caséine, le chiffre obtenu pour l'azote de l'histidine est supérieur à l'azote total de la fraction examinée.

Il en conclut que d'autres substances ont absorbé le brome, en particulier, la tyrosine et les produits de dégradation du trytophane déjà signalés par Plimmer et Philipps eux-mêmes.

Méthode de Knoop.

En 1908, Knoop [111] constate que l'histidine chauffée avec l'eau de brome donne une coloration rouge avec formation d'un précipité noir si elle est en quantité suffisante. Cette réaction donnée par l'histidine et l'histamine, n'est pas donnée par les autres dérivés du groupe imidazol, acide imidazol-propionique, acide imidazol-acétique.

La réaction est peu sensible et la coloration disparaît sous l'action d'un excès de brome. C'est pour cela que Hunter [112] s'assure que le brome n'est pas en excès par addition de chloroforme qui se colore en jaune dès l'apparition de brome non absorbé. Il remarque que les flocons formés dans la réaction sont solubles dans l'ammoniaque en donnant une coloration rouge violacée, mais estime que l'intensité de la coloration est fonction de l'ammoniaque ajoutée. Il ajoute des quantités croissantes d'eau de brome à une quantité donnée d'histidine et détermine que, après chauffage, la coloration maxima est atteinte en mettant en présence 3 atomes de Br et 1 molécule d'histidine.

Lieben et Muller [113] font agir longuement le brome sur l'histidine : après 3 à 5 heures, plus de 2 atomes de brome sont fixés par molécule d'histidine. L'histidine fixe d'abord le brome par son noyau imidazol par substitution puis par oxydation.

Regina Kapeller-Adler [114] dose colorimétriquement l'histidine en utilisant la coloration rouge violacée signalée par Hunter [110] obtenue par dissolution dans l'ammoniaque des produits de la réaction du brome sur l'histidine à chaud. La technique est la suivante :

Dans un tube gradué de 10 cm³ verser 1 à 2 cm³ de solution à doser, puis ajouter goutte à goutte du réactif bromé (1) jusqu'à coloration jaune persistante. Après 10 minutes de contact, verser 2 cm³ du réactif ammoniacal (2) et porter 5 minutes dans l'eau chaude. Laisser refroidir 10 minutes et compléter à 10 cm³ avec de l'alcool à 96°. La coloration reste stable plusieurs heures.

Les résultats sont les suivants :

Sur une moyenne de 10 dosages, les résultats sont exacts à 3 % près, mais certains chiffres s'écartent de 8 à 10 % de la moyenne, soit au-dessus, soit au-dessous. Nous avons retrouvé ces écarts dans de nombreuses expériences, et souvent même des écarts supérieurs.

Causes d'erreur.

Nous avons recherché les causes d'erreur et nous avons étudié l'action propre de deux facteurs : l'ammoniaque et le brome.

1° *Ammoniaque* : Des dosages sont effectués selon la technique prescrite sur 4 solutions renfermant chacune 1 mgr. d'histidine dans 1 cm³ ; mais les volumes de solution ammoniacale ajoutés on été respectivement de 1, 1,5, 2, 2,5 cm³.

La coloration obtenue est identique dans les 4 tubes.

2° *Brome* : Les dosages sont effectués selon la technique prescrite en augmentant progressivement le volume de réactif bromé :

Histidine mgr.	Réactif bromé cm³	Histidine dosée mgr.
1	0,20	0,77
1	0,25	1
1	0,30	0,80
1	0,35	0,69
1	0,40	0,62

1.	Brome	1 cm³
	Acide acétique	33 cm³
	Eau distillée	100 cm³
2.	Ammoniaque	200 cm³
	Carbonate d'ammoniaque	10 gr.
	Eau distillée, q. s	300 cm³

La solution contenant 0,25 cm³ de réactif bromé présentant la coloration la plus intense, a été prise comme témoin.

Cette expérience montre que, pour une quantité insuffisante de brome, la réaction n'est pas complète et que, pour un large excès, elle n'est plus quantitative.

Le brome est donc un facteur important dans l'irrégularité des résultats. Son action parasite peut s'exercer de deux manières :

a) Oxydation du noyau imidazol ;

b) Dénaturation de la coloration.

a) *Oxydation du noyau imidazol* :

Lorsque la solution bromée est ajoutée goutte à goutte à l'histidine, le brome est absorbé peu à peu et la coloration jaune qui semble stable à prime abord disparaît. Il est très difficile de savoir quand le brome est en quantité suffisante puisque la coloration n'est pas fixe.

L'oxydation du noyau imidazol est démontrée par les travailleurs qui ont cherché à établir un indice de brome : celui-ci est très variable avec le temps de contact.

Nous avons recherché si la réaction de substitution est instantanée ou du moins très rapide, de façon à réduire le temps de contact et éviter l'oxydation du noyau :

Des dosages sont effectués selon la technique prescrite mais en ajoutant la solution ammoniacale 2 minutes (au lieu de 5) après le réactif bromé et en faisant varier les volumes de ce dernier :

Histidine pesée mgr.	Réactif bromé cm³	Histidine dosée mgr.
1	0,20	1
1	0,25	1,05
1	0,30	1,11
1	0,35	1,18

La solution contenant 0,20 cm³ de réactif bromé a été prise comme témoin.

La réaction de substitution n'est donc pas instantanée et elle est d'autant plus rapide qu'il y a plus de brome en réaction.

b) *Dénaturation de la coloration* :

En terminant le dosage par l'addition de traces de réactif bromé, la coloration change rapidement, s'atténue et disparaît.

Essais d'amélioration de la technique.

Nous avons cherché à éliminer le brome dès la fin de la réaction de substitution et annihiler par suite ses actions parasites.

La question serait résolue par l'emploi d'un corps possédant un degré d'affinité pour le brome tel qu'il permette la substitution du noyau et empêche son oxydation.

Nous nous sommes adressé aux phénols. La plupart précipitent dans le milieu où s'effectue le dosage ou dénaturent la coloration. Seul, le phénol a retenu plus longuement notre attention. Si, en suivant la technique du dosage, on verse I goutte de solution de phénol à 5 % avant l'addition du réactif ammoniacal, on obtient une coloration violacée, légèrement différente de la coloration normale, mais qui s'atténue peu à peu. Si le phénol élimine l'action du brome sur la coloration, il élimine aussi l'action du brome sur le noyau. L'addition de phénol 2 minutes après l'entrée du brome en réaction arrête l'action de ce réactif.

Histine mgr.	Réactif bromé cm3	Phénol à 5 %	Histidine dosée mgr.
1	0,25	1 goutte	1
1	0,30	1 goutte	1,07
1	0,35	1 goutte	1,12
1	0,40	1 goutte	1,20

Nous n'avons donc pu trouver un régulateur convenable de l'action du brome.

Conclusion.

Les méthodes colorimétriques du brome ne sont pas à retenir pour un dosage exact de l'histidine par suite de l'impossibilité d'éliminer les actions parasites de ce réactif.

Nous avons étudié en détail la technique de Kapeller-Adler et constaté que le brome exerce sur l'histidine en plus de son action de substitution, une action parasite d'oxydation, un excès de brome dénaturant en outre la coloration obtenue. Nous avons cherché sans succès un régulateur de l'action du brome d'une affinité pour ce dernier telle qu'elle permette la substitution et empêche l'oxydation. La méthode de Kapeller-Adler ne devra être retenue

qu'à condition d'opérer une dizaine de dosages sur chaque échantillon, la précision restant de l'ordre de 10 %.

BIBLIOGRAPHIE

108. Plimmer R. H. A. and Eaves E. C. — The estimation of tyrosin by bromination. *Biochem. J.*, 1913, **7**, 297.

109. Plimmer R. H. A. and Philips H. — The analysis of proteins. III. Estimation of histidin and tyrosin by bromination. *Bioch. J.*, 1924, **18**, 312.

110. Calvery H. O. — Basic amino-acids. The estimation of the basic amino-acids in small amounts of casein and edestin by the modified method of Vickery and Leavenworth and other methods. *J. of biol. Chem.*, 1929, **83**, 631.

111. Knoop F. — Eine Farbenreaktion des Histidins. *Hofmeisters Beitr.*, 1908, **11**, 356.

112. Hunter G. — Note on Knoop's test for Histidin. *Bioch. J.*, 1922, **16**, 637.

113. Lieben F. und Muller R. — Uber die Bromaufnahme von Casein, sowie von Casein- und Keratinydrolysaten. *Bioch. Ztschr.*, 1928, **197**, 119.

114. Kapeller-Adler R. — Uber eine neue Method zur quantitativen Histidinbestimmung und über deren Anwendbarkeit zur Untersuchung von biologischen Flüssigkeiten, insbesondere von Gravidenharnen. *Bioch. Ztschr.*, 1933, **164**, 131.

MÉTHODE DE KOSSEL ET STAUDT

Kossel et Gross [87] avaient dosé l'arginine par la précipitation à l'état de flavianate.

La solubilité du flavianate d'arginine est négligeable dans une solution d'acide flavianique *N*/50 et est de 0,0177 % dans l'eau.

Le flavianate d'histidine est plus soluble : 0,128 % dans une solution d'acide flavianique *N*/50 et 0,146 % dans l'eau.

Aussi Kossel et Staudt [115] ont-ils effectué un dosage basé sur ces différences de solubilité : l'arginine et l'histidine traités par un sel d'argent sont précipités par la baryte. Sur une partie aliquote, on dose l'azote total, sur l'autre partie, on effectue le dosage de l'arginine par précipitation par l'acide flavianique. Par différence on calcule l'histidine.

Il est évident qu'il faut opérer à des dilutions telles que le flavianate d'histidine soit soluble, ce qui suppose une connaissance préalable de la teneur en histidine du produit à étudier. Il semble difficile d'éviter l'entraînement du flavianate d'histidine par le flavianate d'arginine.

Vickery [116] étudie les flavianates d'histidine, le flavianate obtenu par addition d'acide flavianique en excès est le diflavianate. Par action de la quantité théorique d'acide flavianique pour obtenir le monoflavianate d'histidine, on obtient un mélange de mono- et de di-flavianate.

Nous avons vérifié qu'en opérant sur des solutions concentrées pures, la précipitation du diflavianate d'histidine est complète.

Vickery et Leavenworth [30] ont appliqué ce dosage à la fraction histidinique de leurs hydrolysats après séparation de l'arginine par l'argent.

Calvery [110], après avoir précipité l'histidine à l'état de sel d'argent, puis isolé à l'état de complexe mercurique par le réactif d'Hopkins, n'a pas pu obtenir à l'état de flavianate plus de 80 %

de l'azote de la solution ainsi traitée. Il semble bien que le flavianate d'histidine n'ait pas précipité intégralement.

Block (116 *bis*) a récemment abandonné la méthode de Vickery et Leavenworth (30) pour utiliser celle de Kappeler-Adler (page 68) qu'il estime plus précise.

Conclusions.

La méthode de Kossel et Staudt, méthode par différence, ne peut être retenue car elle suppose connu le résultat cherché et elle expose à de fortes erreurs si des quantités, même faibles, d'histidine précipitent avec l'arginine.

La méthode de Laevenworth, méthode de dosage direct, ne peut être retenue car la précipitation du flavianate d'histidine dans les milieux complexes n'est pas encore suffisamment connue.

BIBLIOGRAPHIE

30. Vickery H. B. et Leavenworth C. S. — Modifications of the method for the determination of the basic amino-acids of proteins. The bases of edestin. *J. of biol. Chem.*, 1928, **76**, 707.

87. Kossel A. et Gross R. E. — Uber die Darstellung und quantitative Bestimmung des Arginins. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1924, 135. 167.

110. Calvery H. O. — Basic amino-acids. The estimation of the basic amino-acids in smoll amounts of casein and edestin by the modified method of Vickery and Leavenworth and other methods. *J. of biol. Chem.*, 1929, **83**, 631.

115. Kossel A. et Staudt W. — Uber die quantitative Bestimmung von Arginine und Histidine. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1926, **156**, 270.

116. Vickery H. B. — A useful compound of histidine. *J. of biol. Chem.*, 1926, **71**, 303.

116 *bis*. Block R. J. — The basic 1mino acids of three crystalline mammalian hemoglobins. *J. of biol. Chem.*, 1934, **105**, 663.

RÉSUMÉ

Les méthodes de dosage direct de l'histidine ont été exposées successivement et l'étude critique des principales techniques a été entreprise.

Nous en concluons que toutes ces méthodes présentent un manque de sensibilité net ou sont sujettes à des erreurs provenant de l'action parasite d'autres substances.

Rejetant la méthode de Koessler et Hanke, la réaction de base étant une diazotation (ce qui n'est pas très spécifique dans les hydrolysats protéiques), nous conseillons la méthode de Kapeller-Adler qui doit être utilisée avec la plus grande prudence (une dizaine de dosages par échantillon) et dont la précision est de l'ordre de 10 %.

IV

Etude de la précipitation de l'arginine et de l'histidine à l'état de sel d'argent.

Cette étude comporte cinq parties :

I. Dosage de l'acide aminé ;
II. Obtention du sel d'argent de l'acide aminé ;
III. Mesure du *pH* ;
IV. Etude de l'arginate d'argent ;
V. Etude de l'histidinate d'argent.

I. — Dosage de l'acide aminé expérimenté.

Nous n'avons opéré que sur un seul acide aminé dans chaque expérience. Le dosage le plus facile et le plus précis est donc celui de l'azote. Nous avons utilisé la méthode de Kjeldahl. Après élimination de l'argent par l'hydrogène sulfuré en milieu acétique, la solution est concentée par évaporation au bain-marie. Le résidu est détruit par l'acide sulfurique en présence de bisulfate de potassium et de sulfate de cuivre. L'ammoniaque formée est distillée dans l'appareil de Pregl et reçue dans une quantité connue d'acide sulfurique dont l'excès est dosé par la soude *N*/70 en présence de rouge de méthyle. La soude est titrée en azote à l'aide de glycocolle et d'urée.

Cette méthode sur des solutions d'arginine et d'histidine pures a donné des erreurs ne dépassant pas 1 %.

II. — Obtention du sel d'argent, de l'acide aminé.

Nous envisagerons :

1° Le choix et la préparation de la source d'argent ;
2° La préparation du sel d'argent de l'acide aminé.

1° Choix et préparation de la source d'argent.

Les auteurs se sont adressés comme donateur d'argent au nitrate, au sulfate ou à l'oxyde d'argent.

Le nitrate rend impossible l'observation de la marche de la réaction, à l'aide de la méthode de Kjeldahl, par l'azote qu'il contient. Il est de plus fort difficile à éliminer par la suite.

Le sulfate d'argent peu soluble, exige de grands volumes de solvants, et par suite, des corrections de solubilité. De plus, l'acide sulfurique est éliminé par précipitation par la baryte. Il faut des quantités importantes d'eaux de lavage pour décoller l'acide aminé adsorbé par le sulfate de baryum.

L'oxyde d'argent humide paraît le réactif de choix, mais les auteurs ont toujours employé l'acide sulfurique pour faire varier l'acidité de la solution. L'inconvénient est alors le même que pour le sulfate d'argent.

Notre choix s'est fixé sur l'acétate d'argent précipité. Il offre les avantages de l'oxyde d'argent humide quant aux faibles volumes où il permet de travailler. Par la facilité d'élimination de l'acide acétique, il permet d'atteindre aisément toutes les valeurs de *pH* de 3,5 à 7, et par la solubilité de l'acétate de baryum, il permet d'alcaliniser par la baryte sans effectuer de filtration.

La précipitation de l'acétate d'argent précipité comporte deux phases :

a) Préparation de l'acétate d'argent ;
b) Précipitation de l'acétate d'argent.

a) *Préparation de l'acétate d'argent.*

Dans une capsule de porcelaine, 900 cm³ d'eau sont portés à l'ébullition, puis additionnés de 90 cm³ de solution d'acétate de sodium sec à 20 %. Dans la solution bouillante, sont versés peu à peu 150 cm³ de nitrate d'argent à 20 %. La capsule est immédiatement retirée du feu et placée à l'abri de la lumière.

Après 24 heures, les cristaux formés sont lavés à l'eau jusqu'à disparition de l'acide nitrique, puis séchés à l'abri de la lumière dans un dessiccateur à vide.

L'argent peut être récupéré dans les eaux-mères par alcalinisation à la potasse.

L'oxyde d'argent obtenu est, après lavages, dissous dans l'acide nitrique.

b) *Précipitation de l'acétate d'argent.*

Pour préparer le réactif, une solution saturée bouillante d'acétate d'argent est versée dans le double de son volume d'alcool à 90°. Après 24 heures de repos, l'acétate d'argent est filtré à la trompe jusqu'à obtention d'une pâte humide.

2° Préparation du sel d'argent de l'acide aminé.

10 cm³ d'acide aminé sont dissous dans 10 cm³ d'eau ou d'eau acétique. En saturant largement la solution avec la pâte à l'acétate d'argent, l'acide aminé est, après 2 heures de contact, transformé en sel d'argent comme nous le verrons par la suite.

III. — Mesure du *pH*.

Nous étudierons :

1° Les méthodes colorimétriques ;
2° Les méthodes électrométriques.

1° Méthodes colorimétriques.

La réaction du milieu au sein duquel précipitent les sels d'argent des acides diaminés a été longtemps déterminée sans précision. Kossel et Pringle [22], puis Weiss [23] saturent de carbonate de baryum à l'ébullition.

Kossel et Eldbacher [26] étudient la réaction à l'aide du tournesol, de la phtaléine et du bleu de thymolphtaléine.

Vickery et Leavenworth [28] utilisent le bleu de bromothymol ; ils regrettent de ne pouvoir utiliser une méthode potentiométrique, la présence d'argent interdisant l'emploi de l'électrode d'hydrogène, la présence de baryte celui de l'électrode d'oxygène.

Les méthodes colorimétriques sont en effet défectueuses pour trois raisons :

a) Ces méthodes sont peu sensibles et l'appréciation de la première décimale du *pH* est délicate si on opère à la touche ;

b) La présence d'argent est nuisible car il y a réaction entre l'indicateur et le métal ;

c) Les amino-acides ont un effet qui leur est propre et évalué par Clark [117] comme pouvant atteindre 0,2 à 0,3.

Les résultats obtenus sont assez incertains et souvent contradictoires suivant les indicateurs utilisés : c'est ainsi qu'une solution faisant à peine virer le papier de phtaléine, soit à *pH* 8-8, 2, s'est trouvée au-dessus de la zone sensible de l'orthocrésolphtaléine, soit à *pH* supérieur à 9,8.

2° Méthodes électrométriques.

Ainsi que Vickery et Leavenworth l'avaient signalé, les méthodes courantes électrométriques ne sont pas utilisables. Nous nous sommes adressé à l'électrode de verre qui ne réagit pas avec les solutions à étudier et permet d'opérer sur de faibles volumes. Il faut prendre soin de laver soigneusement les électrodes, la moindre trace de chlorure de potassium précipite l'argent des solutions à étudier ; le chlorure d'argent déposé sur les parois de la nacelle fausse les résultats.

Par cette méthode, nous avons établi que, dans les solutions étudiées, les résultats obtenus par colorimétrie sont nettement insuffisants : un *pH* apprécié à 7,3 au rouge de phénol est en réalité de *pH* 7,6 ; le papier de phtaléine ne vire franchement qu'à *pH* 9,8.

IV. — Etude de l'arginate d'argent.

Cette étude comprend deux parties :

1° Précipitation de l'arginate d'argent en alcalinisant par la baryte en fonction du *pH* sans excès d'acétate d'argent ;

2° Précipitation en présence d'un excès d'acétate d'argent.

1° Précipitation sans excès d'acétate d'argent.

L'arginine mise en solution dans 10 cm³ d'eau est traitée par la pâte à l'acétate d'argent. La solution est acidifiée par l'acide acétique jusqu'à virage du rouge de méthyle, soit *pH* 5, puis filtrée. Le filtrat est alors traité par la baryte jusqu'à obtention d'un *pH* estimé par colorimétrie et par électrométrie.

Tableau N° 1.

PRÉCIPITATION DE L'ARGINATE D'ARGENT
SANS EXCÈS D'ACÉTATE D'ARGENT

pH	Indicateur	Arginine en réaction mgr.	Arginine précipitée mgr.	Arginine en solution mgr.
	1re Expérience.			
5	Rouge de Méthyle	146,7	9,1	137,6
7,2	Rouge de Phénol	113,1	5,1	108
7,2	Electr.			
8	Début virage Phénolphtaléine	85,4	33,7	51,7
8,4	Electr.			
	2e Expérience.			
5	Rouge de Méthyle	87,8	5,7	82,1
7,4	Rouge de Phénol	73,2	4,2	69
7,65	Electr.			
8,2	Phtaléine rose	52,8	44,6	8,2
9,8	Electr.			
	3e Expérience.			
5	Rouge de Méthyle	119,5	84,7	114,8
7,5	Rouge de Phénol	102,2	12,9	89,3
7,8	Electr.			
8,2	Phtaléine rouge	70	57,2	11,8
10,8	Electr.			
	4e Expérience.			
5	Rouge de Méthyle	119	13,2	105,8
7,8	Rouge de Phénol	103,3	28,5	74,8
7,2	Electrom.			
8,3	Phtaléine rose	49	37,6	11,4
9,4	Electr.			
	5e Expérience.			
5	Rouge de Méthyle	139,8	3,8	136
7,4	Rouge de Phénol	109,4	6,8	102,6
7,65	Electr.			
8,4	Phtaléine rose	73,4	55,8	17,6
9,4	Electr.			

Ainsi, dès $pH = 7,2$, l'arginate d'argent précipite, mais la précipitation totale n'a pu être obtenue même à une forte alcalinité.

2° Précipitation en présence d'un excès d'acétate d'argent.

L'arginine mise en solution dans 10 cm³ d'eau est traitée par la pâte à l'acétate d'argent, puis additionnée de baryte jusqu'à obtention d'un *pH* estimé par colorimétrie ou par électrométrie. La solution est filtrée, puis le précipité lavé avec 20 cm³ d'eau.

Tableau N° 2.

PRÉCIPITATION DE L'ARGINATE D'ARGENT
EN PRÉSENCE D'UN EXCÈS D'ACÉTATE D'ARGENT

pH	Indicateur	Arginine pesée mgr.	Arginine précipitée mgr.	Arginine en solution mgr.
—	—	—	—	—
	1° *pH* colorimétrique.			
7,2	Rouge de Phénol	115,5	14,5	101
7,3	Rouge de Phénol	87,7	31,2	56,5
7,3	Rouge de Phénol	106,3	49,7	56,6
7,4	Rouge de Phénol	113,2	59,4	53,8
7,4	Rouge de Phénol	140,1	73,1	67
8,2	Phénol Phtaléine	63,2	62,3	0,9
8,4	Phénol Phtaléine	114,5	114,1	0,4

pH	Arginine pesée mgr.	Arginine précipitée mgr.	Arginine en solution mgr.
—	—	—	—
2° *pH* électrométrique.			
7,17	126,5	20,5	106
7,18	131	26,3	104,7
7,2	118	39	79
(1) 7,65	106,3	49,7	56,6
(1) 7,74	140,1	73,1	67
8,2	66,6	31,6	35
8,4	124,9	78,2	46,7
(1) 9,8	114,5	114,1	0,4

Ainsi, dès *pH* = 7,17, l'arginate d'argent précipite, la précipitation est totale à partir de *pH* = 9,8.

En comparant les résultats avec et sans excès d'acétate d'argent,

(1) Ces expériences ont été effectuées par détermination colorimétrique et électrométrique.

il apparaît que la disparition de l'arginine de la solution est due à deux causes :

1° Précipitation réelle de l'arginate d'argent, ainsi que le montrent les expériences sans excès d'acétate d'argent ;

2° Entraînement de l'arginine ou de son sel argentique par l'acétate d'argent saturant la solution et l'oxyde d'argent qui précipite dès la neutralisation.

Tableau N° 3.

ARGININE RETENUE PAR L'ACÉTATE D'ARGENT A $pH = 5$

Arginine pesée mgr.	Arginine retenue mgr.	Arginine retenue %
146,7	9,1	6,2
87,8	5,7	6,7
119,5	4,7	3,9
119	13,2	11
139,8	3,8	2,7

V. — Etude de l'histidinate d'argent.

Cette étude comporte deux parties :

1° Précipitation de l'histidinate d'argent par la baryte sans excès d'acétate d'argent ;

2° Précipitation en présence d'un excès d'acétate d'argent.

1° Précipitation sans excès d'acétate d'argent.

La technique est identique à celle utilisée pour l'étude de l'arginate d'argent.

Tableau N° 4.

PRÉCIPITATION DE L'HISTIDINATE D'ARGENT SANS EXCÈS D'ACÉTATE D'ARGENT

pH	Histidine en réaction mgr.	Histidine précipitée mgr.	Histidine en solution mgr.
6,9	85,9	70,3	15,6
7,02	85,5	82,6	2,9
7,02	60,5	58,3	2,2
7,03	71,7	68,9	2,8
7,03	65,6	61,9	3,7
7,15	74,2	72,6	1,6

Tableau N° 4 *bis*.

HISTIDINE RETENUE PAR L'ACÉTATE D'ARGENT A $pH = 5$

Histidine pesée mgr.	Histidine retenue mgr.	Histidine retenue %
97	11,1	11,4
71,5	9,8	13,6
97,5	12	12,3
70	9,5	13,5
75	9,4	12,5
84,8	10,6	12,5

L'histidine ne précipite pas entièrement à $pH = 6,9$, mais pres. que entièrement à pH plus élevé.

2° Précipitation en présence d'un excès d'acétate d'argent.

La technique est identique à celle utilisée pour l'étude de l'arginate d'argent. Les résultats sont groupés par séries d'expérimentation. L'influence importante du facteur entraînement ne permet de comparer entre eux que les résultats obtenus avec le même réactif argentique.

Tableau N° 5.

PRÉCIPITATION DE L'HISTIDINATE D'ARGENT
EN PRÉSENCE D'UN EXCÈS D'ACÉTATE D'ARGENT

pH	Histidine pesée mgr.	Histidine précipitée mgr.	Histidine en solution mgr.
1re Expérience.			
7,01	104	52,6	51,4
7,04	59	30,9	28,1
7,08	108	68	40
2e Expérience.			
7,01	131	119,3	11,7
7,13	59,7	59	0,7
7,15	80,8	80,6	0,2
3e Expérience.			
7,05	153,4	72,8	80,6
7,12	130,7	81	49,7
7,58	81,5	81,3	0,2

4e Expérience.

pH	Histidine en réaction mgr.	Histidine précipitée mgr.	Histidine en solution mgr.
7	119,6	92	27,6
7,05	104,2	80,1	64,1
7,12	184	156,8	27,2
7,14	138,2	128	10,2
7,22	114,8	117,7	7,1

Dans chaque série, la précipitation augmente avec le *pH*. Elle est complète pour un *pH* de 7,2.

Discussion.

Nos résultats expliquent les différences obtenues par les auteurs qui se sont efforcés de faire varier le *pH* de précipitation de l'histidinate d'argent.

Rosedale [32] a analysé un hydrolysat de poisson selon deux techniques : une fraction saturée de sulfate d'argent a été traitée par la baryte jusqu'à obtenir une acidité de 1,5 %, l'autre fraction a été traitée jusqu'à *pH* = 7 selon la méthode de Vickery et Leavenworth [28].

N des acides aminés	V. et L.	R.
Histidine	6,3 %	4,1 %
Arginine	8,4 %	9,9 %
Lysine	5,7 %	5,8 %

Nos résultats montrent que Vickery et Leavenworth ont entraîné de l'arginine dans la fraction histidine et que Rosedale n'a pas entièrement précipité l'arginine.

Enfin le passage d'une partie de l'arginate d'argent en solution en milieu alcalin (118) est expliqué par nos expériences faites sur l'arginine en l'absence d'excès d'acétate d'argent.

Conclusion.

Nos résultats mettent en évidence les limites exactes de précipitation par la baryte de l'arginine et de l'histidine à l'état de sels

d'argent. Ils nous permettent d'expliquer les résultats différents obtenus par les auteurs à l'aide de techniques légèrement dissemblables.

La conclusion générale de cette étude est l'impossibilité de séparer l'arginine et l'histidine par une précipitation fractionnée de leurs sels d'argent par la baryte.

BIBLIOGRAPHIE

22. Kossel A. et Pringle H. — Uber protamina und histon. III. Uber das Histon. *Ztschr. für Physiol. Chem.*, 1906, **49**, 314.
23. Weiss F. — Untersuchungen über die Bildung des Lachsprotamins. *Ztschr. für Physiol. Chem.*, 1907, **52**, 107.
26. Kossel A. et Eldbacher S. — Uber die Trennung von Histidin und Arginin. *Ztschr. für Physiol. Chem.*, 1920, **110**, 241.
28. Vickery H. B. et Leavenworth C. S. — On the separation of histidin and arginin. II. The separation of the silver compounds at pH = 7,0. *J. of biol. Chem.*, 1927, **72**, 403.
32. Rosedale J. L. — The amino-acids of flesh. III. The diamino-acids content of fish. *Biochem. J.*, 1929, **23**, 161.
117. Clark M. — The determination of hydrogen ions, 717 pages. Baltimore, 1928. The Williams and Wilkins Company, Editeur.
118. Leavenworth C. S. — On the basic amino-acids yielded by casein. *J. of biol. Chem.*, 1924, **61**, 315.

V

Étude de la séparation de l'arginine et de l'histidine à l'aide des composés mercuriques.

C'est en traitant par le bichlorure de mercure un hydrolysat sulfurique de matières protéiques neutralisé par le baryte, que Kossel [119] constate la précipitation de l'histidine par un sel de mercure. La réaction n'est pas quantitative. Peu après, Kossel [48] constate que la précipitation est complète quand l'histidine est traitée par le bichlorure de mercure en l'absence de sels neutres et de gaz carbonique jusqu'à une dilution de 1/500 seulement.

La séparation par le bichlorure de mercure a néanmoins été utilisée par de nombreux auteurs, entre autres Engeland [120] et Brazier [47]. Nous avons vu que cette séparation ne saurait être recommandée par suite de la solubilité du complexe histidine-bichlorure de mercure.

En 1901, Hopkins et Cole [121] donnent la formule d'un réactif mercurique :

Sulfate mercurique	10 g.
Acide sulfurique	5 cm³
Eau	100 cm³

Ce réactif, dénommé par la suite : Réactif d'Hopkins, est utilisé principalement pour la précipitation du tryptophane. En 1903, Kossel et Patten [21] l'utilisent pour l'histidine et s'assurent que l'arginine n'est pas entraînée dans le précipité :

0,539 gr. de carbonate d'arginine (en azote) sont dissous dans l'acide sulfurique à 10 %. On ajoute 0,500 gr. d'histidine (en azote), puis du sulfate mercurique. On filtre. L'azote du filtrat est 0,544 gr., soit à 0,005 gr. près, celui de l'arginine mise en réaction.

Osborne, Leavenworth et Brautlecht [24] ne considèrent

pas la précipitation comme complète puisqu'ils reprécipitent l'histidine des eaux-mères par le nitrate d'argent et la baryte en milieu neutre.

Mais en traitant un hydrolysat de caséine par le réactif d'Hopkins, Onslow [122] précipite l'histidine et s'assure de l'absence d'arginine par l'expérience suivante :

Le précipité mercurique est décomposé par l'hydrogène sulfuré, puis l'histidine précipitée sous forme de sel d'argent par la baryte en milieu neutre. Après filtration, une alcalinisation de la solution ne donne pas de précipité d'arginate d'argent.

Aussi Vickery et Leawenworth [30] utilisent-ils le réactif d'Hopkins pour isoler l'histidine après une séparation argentique dans leur méthode de fractionnement des acides diaminés.

Calvery [110] fait l'étude de la précipitation de l'histidine par le réactif d'Hopkins en fonction de l'acidité, étude similaire de celle d'Onslow [123] sur le tryptophane qui montre la sensibilité du précipité à la réaction du milieu.

L'histidine, traitée par le sulfate mercurique donne un composé mercurique dont l'insolubilité est complète pour une concentration en acide sulfurique de 3 à 5 % en poids, mais soluble pour une concentration en acide sulfurique supérieure à 13 %. Ces résultats avaient déjà été entrevus par Onslow [9].

Calvery n'a pas établi que l'arginine n'était pas précipitée avec l'histidine, aussi avons-nous repris la question pour préciser les conditions optima de précipitation de l'histidine et le comportement de l'arginine.

Nous étudierons successivement : la préparation du réactif, la précipitation de l'histidine, enfin, le comportement de l'arginine.

Préparation du réactif d'Hopkins.

La formule donnée par Hopkins a été différemment interprétée. Calvery a adopté la suivante :

Sulfate mercurique	10 g.
Acide sulfurique pur	5 cm³
Eau distillée q. s. p.	100 cm³

Le sulfate mercurique du commerce est un produit impur dont les solutions sulfuriques ne sont pas claires et qui troublent après filtration.

Nous avons préparé du sulfate mercurique selon les indications de Folin et Ciocalteu [124].

80 gr. de bisulfate de mercure du commerce sont traités par 80 cm³ d'acide sulfurique à 10 %. Après centrifugation, le liquide surnageant est versé goutte à goutte dans 200 cm³ d'acide sulfurique pur. Après centrifugation, le précipité est lavé à l'acide sulfurique pur, puis à l'alcool, enfin à l'éther.

Le bisulfate de mercure ainsi obtenu se dissout parfaitement dans l'acide sulfurique à 5 %.

Précipitation de l'histidine.

Cette étude comprend deux parties :

1° la précipitation ;

2° le lavage du précipité.

1° Précipitation.

Nous avons recherché les conditions d'acidité optima pour la précipitation de l'histidine par le réactif d'Hopkins.

Nous n'avons pu estimer cette acidité qu'en décrivant les conditions expérimentales, la méthode de titration de l'acide sulfurique en présence de sulfate mercurique utilisée par Calvery [110] ne nous paraissant pas acceptable.

Dans un tube de centrifugation, la solution d'histidine est additionnée peu à peu de l'acide sulfurique, puis du réactif d'Hopkins. Après 24 heures de repos, le précipité est centrifugé et l'azote de la liqueur dosé par la méthode de Kjeldahl.

Voici les résultats obtenus, d'une part sur des quantités d'histidine semblables, d'autre part sur des quantités d'histidine variables :

Histidine pesée mgr.	Eau cm³	Acide sulfurique cm³	Réactif d'Hopkins cm³	Histidine précipitée mgr.	Histidine précipitée %
74	10	0	10	73,40	99,3
74	10	0,2	10	72,4	97,9
74	10	0,3	10	72	97,3
74	10	0,5	10	71	96
74	10	0,8	10	63,3	85,5

Histidine pesée mgr.	Eau cm³	Acide sulfurique cm³	Réactif d'Hopkins cm³	Histidine précipitée mgr.	Histidine précipitée %
131,5	15	0	6	130,6	99,3
83,5	14	0	7	83,1	99,5
97,5	13	0	8	97,1	99,6
55,3	12	0	9	55,1	99,2
62,5	12	0,2	9	61,4	98,3
87	12	0,3	9	85,2	98
111	12	0,5	9	105,9	95,5
115	12	0,8	9	113,1	91,9
159	12	1	9	néant	

Afin de rechercher les rapports optimum de solution d'histidine et de réactif, nous avons effectué des expériences semblables aux précédentes, mais où seuls ces deux facteurs varient.

Histidine pesée mgr.	Eau cm³	Réactif d'Hopkins cm³	Histidine précipitée mgr.	Histidine précipitée %
86	0	14	84,7	98,5
86	1	13	85,1	99,1
86	1,5	12,5	85,1	99,1
86	2	12	85,4	99,3
86	2,5	11,5	85,4	99,3
86	3	11	85,4	99,3
86	4	10	85,4	99,3
86	5	9	85,2	99,1

Le précipité obtenu est très fin et il est nécessaire de centrifuger, les résultats obtenus par filtration étant légèrement inférieurs à ceux obtenus par centrifugation.

Histidine pesée mgr.	Eau cm³	Réactif de Hopkins cm³	Histidine précipitée mgr.	Histidine précipitée %
75	6	15	73,5	97,8
75	7	14	73,5	97,8
75	8	13	73,5	97,8
75	9	12	72,7	97
75	10	11	74,3	99
75	11	10	73,8	98,3
75	12	9	74,2	98,9

Nous pouvons conclure qu'en expérimentant sur des volumes égaux de solution d'histidine et de réactif d'Hopkins, la précipitation de l'histidine est complète à moins de 1 % de perte.

2° Lavages du complexe : histidine-sulfate mercurique.

Nous avons essayé des lavages par trois réactifs :

1° Le réactif d'Hopkins pur ;

2° Le réactif d'Hopkins dilué ;

3° L'acide sulfurique à un taux voisin du taux présumé de la solution quand les conditions de précipitation sont optima.

1° *Réactif d'Hopkins* :

95 mgr. d'histidine sont dissous dans 10 cm³ d'eau puis additionnés de 10 cm³ de réactif d'Hopkins. Après 24 heures de repos, le précipité est centrifugé et l'azote total de la liqueur estimé par la méthode de Kjeldahl. Le précipité est lavé trois fois avec 5 cm³ de réactif d'Hopkins.

	Histidine	
	mgr.	% de l'histidine pesée
Eaux-mères	0,9	1
1er lavage	1,1	1,2
2e lavage	4,5	4,8
3e lavage	4,7	5

2° *Réactif d'Hopkins dilué* :

75 mgr. d'histidine sont dissous dans 10 cm³ d'eau puis additionnés de 11 cm³ de réactif d'Hopkins et abandonnés 24 heures au repos. Après centrifugation, le précipité est lavé trois fois avec 7 cm³ de réactif d'Hopkins dédoublé :

	Histidine	
	mgr.	% de l'histidine pesée
Eaux-mères	0,68	0,9
Eaux de lavage	1,1	1,4

3° *Acide sulfurique dilué* :

84 mgr. d'histidine sont dissous dans 10 cm³ d'eau, puis additionnés de 11 cm³ de réactif d'Hopkins et abandonnés au repos pendant 24 heures. Après centrifugation, le précipité est lavé 5 fois avec 10 cm³ d'acide sulfurique à 3,7 %.

	Histidine en solution	
	mgr.	% de l'histidine pesée
Eaux-mères	0,8	1
1er lavage	1	1,2
2e lavage	1,1	1,3
3e lavage	0,9	1,1
4e lavage	1,2	1,4
5e lavage	1,5	1,8

Entraînement de l'arginine.

Comme les solutions d'arginine traitées par le réactif d'Hopkins ne précipitent pas quelle que soit l'acidité du milieu, nous avons étudié la précipitation de l'histidine en présence d'arginine pour voir si cette dernière n'est pas entraînée. Nous avons lavé le précipité. L'azote est dosé dans les eaux-mères et dans les eaux de lavage par la méthode de Kjeldahl. Une expérience effectuée sur une solution d'histidine pure et sans arginine permet de doser par différence l'arginine en solution.

Cette étude comprend trois parties :

1° Précipitation à froid ;
2° Précipitation à chaud ;
3° Précipitation, dissolution et reprécipitation.

1° Précipitation a froid.

10 cm³ de solution d'amino-acides sont traités par 10 cm³ de réactif d'Hopkins et abandonnés au repos pendant 24 heures. Après centrifugation, le précipité est lavé, soit avec du réactif d'Hopkins dédoublé, soit avec de l'acide sulfurique à 3,7 %.

a) *Lavages avec du réactif d'Hopkins dédoublé.* — Le précipité est lavé trois fois.

1re Expérience.

	Histidine *N* total mgr.	Arginine + Histidine *N* total mgr.	Arginine en solution *N* en mgr.
Prise d'essai	21,3	43,2 + 21,3 = 64,5	
Eaux-mères.....	0,2	21	20,8
Eaux de lavage	0,2	3,3	3,1

Arginine en solution (en azote) : 23,9 soit 55,3 %.

2e Expérience.

	Histidine *N* total mgr.	Arginine + Histidine *N* total mgr.	Arginine en solution *N* en mgr.
Prise d'essai	26,8	38,3 + 26,8 = 65,1	
Eaux-mères	0,2	30,1	29,9
Eaux de lavage	0,1	0,2	0,1

Arginine en solution (en azote) : 30 mgr. soit 78,3 %.

b) *Lavages avec de l'acide sulfurique à* 3,7 %. — Le précipité est lavé 4 fois avec le réactif.

	Histidine *N* mgr.	Arginine + Histidine *N* total mgr.	Arginine en solution *N* mgr.
Prise d'essai	26	17,9+26=43,9	
Eaux-mères	0,8	14,1	13,3
1er lavage	1	3,3	2,3
2e lavage.....	1,2	1,4	0,2
3e lavage.....	1,2	1,3	0,1
4e lavage.....	1,3	1,3	0

Arginine en solution (en azote) : 15,9 soit 93,5 %.

2° Précipitation a chaud.

10 cm³ de solution d'amino-acides sont portés à l'ébullition et traités par 10 cm³ de réactif d'Hopkins ajoutés goutte à goutte, puis abandonnés au repos pendant 24 heures. Après centrifugation, le précipité est lavé trois fois avec du réactif d'Hopkins dédoublé, bouillant.

A la température de l'expérience, il se produit une légère réduction du sulfate mercurique décelable par une légère coloration jaune du précipité.

	Histidine *N* mgr.	Arginine + Histidine *N* total mgr.	Arginine en solution *N* mgr.
Prise d'essai	47,3	86+47,3=133,3	
Eaux-mères	0,8	47,6	46,8
Eaux de lavage	0,2	5,9	5,7

Arginine en solution (en azote) : 52,5 soit 61,1 %.

3° Précipitation, dissolution, reprécipitation.

Nous avons recherché s'il est possible, après dissolution du précipité dans l'acide sulfurique, de reprécipiter la solution et quel est alors le comportement de l'arginine.

Nous avons essayé deux techniques de reprécipitation :

a) par dilution ;

b) par neutralisation.

a) *Par dilution* :

10 cm³ de solution d'amino-acides sont traités par 10 cm³ de réactif d'Hopkins et abandonnés 24 heures au repos. Après centri-

fugation, le précipité est dissous dans 5 cm³ d'acide sulfurique pur, puis la solution est additionnée de 95 cm³ d'eau et ultérieurement de 180 cm³ d'eau.

Dans ces conditions, 57,2 mgr. d'histidine et un mélange de 57,2 mgr. d'histidine et 78 mgr. d'arginine n'ont pas précipité à la première dilution et n'ont que déposé légèrement à la longue après la deuxième dilution.

b) *Par neutralisation* :

10 cm³ de solution d'amino-acides sont traités par 10 cm³ de réactif d'Hopkins et abandonnés 24 heures au repos. Après centrifugation, le précipité est dissous dans 20 cm³ de SO^4H^2 $4N$, puis la solution traitée par 20 cm³ de $NaOH$ $4N$. Après 24 heures de repos, on centrifuge.

	Histidine *N* mgr.	Arginine+Histidine *N* total mgr.	Arginine en sol. *N* mgr.
Prise d'essai	25,2	23 + 25,2	
Eaux mères	0,1	6,9	6,8

Arginine en solution (en azote) . 6mgr.6, soit 29,5 %.

Discussion.

Nos résultats ne sont pas en accord avec ceux de Kossel et Patten [21], mais il faut marquer que ces auteurs n'ont pas opéré avec un témoin d'histidine pure.

L'entraînement de l'arginine dans le précipité histidine-sulfate mercurique a échappé à Onslow [122] qui a recherché l'arginine par une méthode argentique qui, nous l'avons démontré, ne peut assurer une séparation exacte de ces deux amino-acides, d'autant plus que, dans le cas présent, il y a un gros excès d'histidine par rapport à l'arginine.

Enfin, nos résultats sont un peu différents de ceux de Calvery en ce que cet auteur ne récupère que 94 % de l'histidine mise en réaction, alors que nous récupérons régulièrement 99 % dans des circonstances semblables.

Conclusion.

Une solution d'histidine à 1 % est intégralement précipitée par un volume égal de réactif d'Hopkins à moins de 1 % de perte.

L'arginine additionnée à la solution d'histidine ainsi traitée ne peut en être extraite par des lavages répétés.

La précipitation à chaud, la dissolution du précipité, puis sa reprécipitation, ne permettent pas de séparer l'arginine du complexe insoluble histidine-sulfate mercurique.

BIBLIOGRAPHIE

21. Kossel A. et Patten A. J. — Zur Analyse der Hexonbasen. *Ztschr. für Physiol. Chem.*, 1903, **38**, 39.
24. Osborne I. B, Leavenworth C. S. et Brautlecht C. A. — The different forms of nitrogen in proteins. *Am. J. Physiol.*, 1908, **23**, 180.
30. Vickery H. et Leavenworth C. S. — Modifications of the method for the determination of the basic amino-acids of proteins. The bases of edestin. *J. of biol. Chem.*, 1928, **76**, 707.
47. Brazier M. A. B. — A new method for the separation of the products of protein hydrolysis. *Biochem. J.*, 1930, **24**, 1188.
48. Kossel A. — Ueber die Constitution der Einfachsten Eiweissstofe. *Ztschr. für Physiol. Chem.*, 1898, **25**, 165.
110. Calvery H. O. — Basic amino-acids. The estimation of the basic amino-acids in small amounts of casein and edestin by the modified method of Vickery and Leavenworth and other methods. *J. of biol. Chem.*, 1929, **83**, 631.
119. Kossel A. — Ueber die Basischen Stoffe des Zelkerns. *Ztschr. für Physiol. Chem.*, 1896-1897, **22**, 176.
120. Engeland R. — Uber den Nachweiss organischer Basen im Harm. *Ztschr. für Physiol. Chem.*, 1908, **57**, 49.
121. Hopkins F. and Cole S. W. — A contribution to the Chemistry of proteids. A preliminary study of a hitherto undescribed product of tryptic digestion. *J. of Physiol.*, 1901, **27**, 418.
122. Onslow H. — On the nature of the substances precipitated by mercuric sulphate from hydrolysed caseinogen with reference to the estimation and isolation of tryptophan. *Biochem. J.*, 1921, **15**, 392.
123. Onslow H. — On the stability of tryptophan in baryta hydrolysis. *Biochem. J.*, 1921, **15**, 383.
124. Folin O. and Ciocalteu V. — On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. The preparation of pure mercuric sulphate. *J. biol. Chem.*, 1927, **73**, 648.

VI

Extraction butylique.

L'exposé de la méthode de Dakin (1) a montré que l'alcool butylique extrayait d'un hydrolysat protéique, les acides monoaminés, la proline et les dicétopipérazines tandis que les acides aminés diacides et les bases hexoniques restaient en solution aqueuse.

Trois modes d'extraction ont été envisagés : agitation, extraction continue à la pression atmosphérique, extraction continue sous pression réduite.

Nous avons étudié l'extraction par l'alcool butylique de l'arginine et de l'histidine et à titre de comparaison de l'alanine et de l'acide glutanique représentant l'un les monoaminés, l'autre les acides dicarboxylés. L'extraction est conduite selon les trois modes envisagés par les auteurs. Nous examinerons les détails techniques d'extraction, puis nous exposerons l'étude de chacun des acides aminés envisagés.

1° Techniques d'extraction.

Trois techniques ont été utilisées :

a) extraction par agitation simple ;
b) extraction à la pression atmosphérique ;
c) extraction continue sous pression réduite.

a) *Extraction par agitation* :

50 cm³ de solution aqueuse d'amino-acide sont agités une à deux heures avec 50 cm³ d'alcool butylique à l'aide d'un agitateur mécanique.

---

1. Voir page 35.

L'émulsion formée est versée dans une ampoule à décantation, après vingt-quatre heures de repos la phase aqueuse est de 45 cm³.

Complétée à 50 cm³ et agitée à nouveau 2 heures avec 50 cm³ d'alcool butylique, elle n'est plus que de 40 cm³. Une deuxième opération similaire ne change sensiblement pas le volume de la phase aqueuse.

b) *Extraction continue à la pression atmosphérique* :

L'appareil utilisé est celui de Fayolle et Lormand.

50 cm³ de solution aqueuse d'amino-acide sont placés dans l'ampoule d'un appareil de 60 cm³, l'appareil est soigneusement calorifugé : un fil d'amiante est enroulé sur la colonne montante des vapeurs d'alcool butylique de façon à préserver l'ampoule, et l'appareil est séparé du ballon inférieur par plusieurs plaques d'amiante superposées. Le ballon est chauffé au bain de sable. En réglant soigneusement le passage de l'alcool butylique à travers la solution à épuiser, celle-ci ne subit aucune diminution de volume en 120 heures.

c) *Extraction continue sous pression réduite.*

L'appareil utilisé est celui de Dudley [50].

50 cm³ de solution aqueuse d'amino-acide sont placés dans le tube à épuisement. Quelles que soient les précautions prises, le volume a diminué au cours de l'extraction.

2° Etude de l'arginine.

Elle a été effectuée à l'aide des trois techniques précédemment décrites. L'extraction a été conduite sur des solutions présentant diverses réactions :

a) Réaction acide ;

b) Réaction très légèrement acide $pH = 6$;

c) Réaction légèrement alcaline $pH = 10{,}97$, point isoélectrique de l'arginine ;

d) Réaction alcaline.

A) Extraction par agitation.

a) *en milieu acide* :

200 mgr. d'arginine ont été dissous dans 50 cm³ d'acide sulfurique $N/50$ et traités trois fois avec 50 cm³ d'alcool butylique :

	Arginine en réaction mgr.	Arginine dosée mgr.
1re extraction	200	200,5
2e extraction	195,6	194
3e extraction	190,7	189

Il n'y a pas d'extraction.

b) *en milieu très légèrement acide* :

112 mgr. 7 d'arginine sont dissous dans 50 cm³ d'eau. La solution est ajustée à $pH = 6$ à l'aide d'acide chlorhydrique dilué puis traitée 2 fois par 50 cm³ d'alcool butylique :

	Arginine en réaction mgr.	Arginine dosée mgr.
1re extraction	112,7	112
2e extraction	110	110

Il n'y a pas d'extraction.

c) *en milieu légèrement alcalin* : $pH = 10,97$:

114 cm. 8 d'arginine sont dissous dans 50 cm³ d'eau distillée neutre. La solution est traitée trois fois par 50 cm³ d'alcool butylique.

	Arginine en réaction mgr.	Arginine dosée mgr.	Arginine extraite	
			mgr.	%
1re extraction	114,8	111,7	3,1	2,7
2e extraction	110	102	8	7,2
3e extraction	100	89,8	10,2	9,8

L'arginine, à son point isoélectrique, est extraite par l'alcool butylique :

d) *en milieu alcalin* :

109 mgr. 9 d'arginine sont dissous dans 50 cm³ d'eau, puis alca-

linisés par II gouttes de soude à 10 %. La solution est traitée deux fois par 50 cm³ d'alcool butylique :

	Arginine en réaction mgr.	Arginine dosée mgr.
1re extraction	109,9	108
2e extraction	103,4	103

200 mgr. d'arginine sont dissous dans 50 cm³ d'eau distillée. La solution est alcalinisée par II gouttes de lessive de soude, puis traitée deux fois par 50 cm³ d'alcool butylique :

Temps d'extraction	Arginine en réaction mgr.	Arginine dosée mgr.
1re extraction	200	200,3
2e extraction	195,6	194

L'arginine n'est donc pas extraite par l'alcool butylique, sauf à son point isoélectrique.

B) Extraction continue a la pression atmosphérique.

a) *en milieu acide* :

115,4 mgr. d'arginine sont dissous dans 50 cm³ d'eau. La solution est acidifiée par II gouttes *HCl* pur et extraite par l'alcool butylique dans l'appareil de Fayolle et Lormand.

Temps d'extraction	Arginine en réaction mgr.	Arginine dosée mgr.
8 heures	115,4	115,1
24 heures	112,8	112,3

616 mgr. d'arginine sont dissous dans 50 cm³ d'eau. La solution est ajustée au virage du rouge Congo à l'aide d'acide chlorhydrique, puis épuisée par l'alcool butylique dans l'appareil de Fayolle et Lormand.

Temps d'extraction	Arginine en réaction mgr.	Arginine dosée mgr.
8 heures	616	611
24 heures	603	602,5

b) *en milieu légèrement alcalin pH* = 10,97 :

482 mgr. 2 d'arginine sont dissous dans 50 cm³ d'eau distillée

neutre ; la solution est épuisée par l'alcool butylique dans l'appareil de FAYOLLE et LORMAND :

Temps d'extraction	Arginine en réaction mgr.	Arginine dosée mgr.	Arginine extraite mgr.	Arginine extraite %
4 heures	482,2	464	18,2	3,8
8 heures	454,8	428	26,8	6
24 heures	419,5	380,7	38,8	9,4
48 heures	372,4	301	71,4	19,2

c) *en milieu alcalin* :

113 mgr. 2 d'arginine sont dissous dans 50 cm³ d'eau. La solution est alcalinisée par II gouttes de lessive de soude, puis épuisée par l'alcool butylique dans l'appareil de FAYOLLE et LORMAND :

Temps d'extraction	Arginine en réaction mgr.	Arginine dosée mgr.
8 heures	113,2	112,8

L'extraction continue à la pression atmosphérique confirme les résultats obtenus par agitation.

C) EXTRACTION CONTINUE SOUS PRESSION RÉDUITE.

Cette méthode n'a été effectuée qu'en milieu acide.

Le volume de la phase aqueuse diminue au cours de l'opération et une perte nette d'arginine se décèle dès 8 heures d'extraction :

	Temps d'extraction	Arginine en réaction mgr.	Arginine dosée mgr.
1re expér.	8 heures	472	460
	24 heures	451	346
2e expér.	8 heures	300	266
3e expér.	8 heures	282	211

La diminution de volume de la solution d'arginine entraînant une perte importante d'arginine par un mécanisme physique, nous n'avons pas étendu nos recherches aux extractions en milieux légèrement alcalin et alcalin.

3° Etude de l'histidine.

Elle a été effectuée à l'aide des trois techniques précédemment décrites. L'extraction a été conduite sur des solutions présentant diverses réactions :

a) Réaction acide :

b) Réaction légèrement acide $pH = 3,76$, point isoélectrique de l'histidine ;

c) Réaction alcaline.

A) Extraction par agitation.

a) *en milieu acide* :

210 mgr. d'histidine sont dissous dans 50 cm³ d'eau, la solution acidifiée par II gouttes d'acide chlorhydrique pur est agitée trois fois avec 50 cm³ d'alcool butylique.

	Histidine en réaction mgr.	Histidine dosée mgr.
1re extraction	210	209,2
2e extraction	205	203,8
3e extraction	199,7	196

b) *en milieu légèrement acide* : $pH = 3,76$:

585 mgr. d'histidine sont dissous dans 50 cm³ d'eau distillée neutre. La solution est agitée trois fois avec 50 cm³ d'alcool butylique.

	Histidine en réaction mgr.	Histidine dosée mgr.	Histidine extraite	
			mgr.	%
1re extraction	585	575	10	1,7
2e extraction	563	545	18	3,2
3e extraction	533	490	43	8

c) *en milieu alcalin* :

118 mgr. d'histidine sont dissous dans 50 cm³ d'eau distillée. La solution alcalinisée par II gouttes de lessive de soude est agitée deux fois avec 50 cm³ d'alcool butylique :

	Histidine en réaction mgr.	Histidine dosée mgr.
1re extraction	118	117
2e extraction	114,7	114

L'histidine n'est pas extraite par l'alcool butylique sauf à son point isoélectrique.

B) Extraction continue a la pression atmosphérique.

a) *en milieu acide* :

315 mgr. d'histidine sont dissous dans 50 cm³ d'eau. La solution acidifiée par II gouttes d'acide chlorhydrique est épuisée par l'alcool butylique dans l'appareil de Fayolle et Lormand.

Temps d'extraction	Histidine en réaction mgr.	Histidine dosée mgr.
—	—	—
8 heures	303	302,8
16 heures	296,8	295

b) *en milieu légèrement acide* : *ph* = 3,76.

337 mgr. 8 d'histidine sont dissous dans 50 cm³ d'eau distillée neutre. La solution est épuisée par l'alcool butylique dans l'appareil de Fayolle et Lormand.

Temps d'extraction	Histidine en réaction mgr.	Histidine dosée mgr.	Histidine extraite	
			mgr.	%
—	—	—	—	—
4 heures	537,8	531	6,8	1,2
8 heures	520,4	505	15,4	3
24 heures	495	421	74	14,9
48 heures	414	300	114	27,5

c) *en milieu alcalin* :

341 mgr. d'histidine sont dissous dans 50 cm³ d'eau. La solution alcalinisée par II gouttes de lessive de soude est épuisée par l'alcool butylique dans l'appareil de Fayolle et Lormand.

Temps d'extraction	Histidine en réaction mgr.	Histidine dosée mgr.
—	—	—
8 heures	341	340

C) Extraction continue sous pression réduite.

Cette méthode n'a été effectuée qu'en milieu acide.

Le volume de la phase aqueuse diminue au cours de l'opération et une perte nette d'histidine se décèle dès 8 heures d'extraction.

Temps d'extraction	Histidine en réaction mgr.	Histidine dosée mgr.
1re expér. 8 heures	395	345
2e expér. 8 heures	177	173
2e expér. 16 heures	170	146

La diminution de volume de la solution d'histidine entraînant une perte importante d'histidine par un mécanisme physique, nous n'avons pas étendu nos recherches aux extractions en milieux légèrement acide et alcalin.

4° Etude de l'acide glutamique.

L'acide glutamique pris comme type des acides dicarboxylés a été étudié en solution légèrement acide ($pH = 6$). L'extraction a été effectuée par agitation et par extraction continue à la pression atmosphérique.

A) Extraction par agitation.

156 mgr. d'acide glutamique sont dissous dans 50 cm³ d'eau.

La solution ajustée à $pH = 6$ est agitée trois fois avec 50 mgr. d'alcool butylique.

	Acide glutamique en réaction mgr.	Acide glutamique dosée mgr.
1re extraction	156	154
2e extraction	151	148,1
3e extraction	144,8	140

B) Extraction continue a la pression atmosphérique.

320 mgr. d'acide glutamique sont dissous dans 50 cm³ d'eau. La solution ajustée à $pH = 6$ est épuisée par l'alcool butylique dans l'appareil de Fayolle et Lormand.

Temps d'extraction	Acide glutamique en réaction mgr.	Acide glutamique dosé mgr.
8 heures	320	319

5° Etude de l'alanine.

L'alanine prise comme type des acides monoaminés, a été étudiée en solution légèrement acide ($pH = 6$). L'extraction a été effectuée par agitation et par extraction continue à la pression atmosphérique.

A) Extraction par agitation.

306 mg. d'alanine sont dissous dans 50 cm³ d'eau. La solution ajustée à $pH = 6$ est agitée trois fois avec 50 cm³ d'alcool butylique.

	Alanine en réaction mgr.	Alanine dosée mgr.	Alanine extraite mgr.	Alanine extraite %
1re extraction	306	270	30	9,8
2e extraction	265,4	221,2	44,2	16,3
3e extraction	216,8	168	48,8	22,5

B) Extraction continue a la pression atmosphérique.

539 mgr. d'alanine sont dissous dans 50 cm³ d'eau. La solution ajustée à $pH = 6$ est épuisée par l'alcool butylique dans l'appareil de Fayolle et Lormand.

Temps d'extraction	Alanine en réaction mgr.	Alanine dosée mgr.	Alanine extraite mgr.	Alanine extraite %
8 heures	539	466,5	72,5	13,4
24 heures	457,2	306,5	150,7	33
48 heures	300,4	160	140,4	46,6
72 heures	156,8	116	40,8	26,1
96 heures	113,7	60	53,7	47,5
120 heures	59	33	26	44

L'alanine est donc extraite par l'alcool butylique.

En 120 heures 539 mgr. ont cédé 506 mgr. à l'alcool butylique, soit 93,5 %.

Conclusions.

L'arginine et l'histidine ne sont pas extraites par l'alcool butylique sauf à leur point isoélectrique. Dans ces conditions, l'alanine

et les autres acides monoaminés sont extraits. Nous avons montré qu'une extraction complète de ceux-ci était fort longue.

On aurait pu espérer extraire l'arginine et l'histidine par leurs solubilités au point isoélectrique après un épuisement des acides monoaminés en milieu acide. L'extraction n'est pas assez rapide ni complète pour réaliser ainsi un dosage exact.

VII

Conclusions.

Au cours de l'étude critique des méthodes de dosage des acides diaminés, nous avons montré :

1° que les chiffres obtenus pour la solubilité des phosphotungstates d'arginine et d'histidine en solutions concentrées sont les mêmes que ceux obtenus par les auteurs en solutions diluées. La précipitation du phosphotungstate d'histidine est alors terminée en 18 heures ;

2° que l'arginate et l'histidinate de cuivre préparés d'après les méthodes de Brazier sont un peu solubles dans l'alcool méthylique et insolubles dans l'alcool isopropylique et les alcools supérieurs; que la précipitation de l'histidine par le bichlorure de mercure préconisée par la même méthode n'est pas complète ;

3° que la réaction colorée sur laquelle est basée la méthode de Sakaguchi n'obéit aux lois de la colorimétrie que pour des quantités très voisines et que par suite, il faut connaître très approximativement le résultat pour effectuer un dosage ;

4° que la décomposition de l'arginine par la soude en ammoniaque ne donne pas exactement la quantité d'ammoniaque théorique (5 %) et que l'histidine traitée dans ces conditions ne dégage pas sensiblement d'ammoniaque ;

5° que la réaction des aldéhydes aromatiques sur l'arginine décrite par Bergmann et Zervas n'est pas complète et que dans le cas où il ne se forme pas de précipité, il y a pourtant réaction ainsi que le montre l'impossibilité de fixer l'argent pour une forte proportion de l'arginine ainsi traitée ;

6° que les résultats obtenus par la méthode de Kapeller-Adler pour le dosage de l'histidine ne présentent une exactitude de 5 % en solutions pures que si on opère de nombreux dosages sur le même échantillon. Les écarts sont dus à une action parasite du brome dont nous avons essayé en vain de régulariser l'action.

Au cours de nos recherches personnelles qui ont porté sur la séparation de l'arginine et de l'histidine et sur l'extraction de ces acides diaminés par l'alcool butylique, nous avons montré que :

7° l'arginine et l'histidine ne peuvent être séparés par la précipitation fractionnée de leurs sels d'argent par la baryte, l'arginine ayant commencé de précipiter alors que l'histidine n'a pas terminé sa précipitation. Nos résultats expliquent les différences obtenues par l'emploi de techniques dissemblables que par acidité du milieu où s'effectue le fractionnement ;

8° la précipitation de l'histidine par le réactif d'Hopkins est complète, mais que l'arginine est entraînée dans le précipité ;

9° les acides diaminés et l'acide glutamique ne sont pas extraits par l'alcool butylique sauf à leur point isoélectrique. L'extraction de l'alanine, pris comme type d'acide monoaminé, est fort longue pour être complète, soit par agitation, soit par extraction à l'aide de l'appareil de Fayolle et Lormand.

L'extraction de l'arginine et de l'histidine par l'alcool butylique à leur point isoélectrique respectif est trop longue pour servir de base à un dosage de ces éléments.

* * *

En résumé, le dosage des acides aminés par les méthodes de fractionnement est soit imprécis (méthodes argentiques, mercurielles ou phosphotungstiques), soit excessivement long (méthode d'extraction par l'alcool butylique). Il faudra recourir à des méthodes de dosage direct des acides diaminés pour obtenir des résultats précis et rapides.

La sensibilité des méthodes actuellement employées et leur manque de spécificité (sauf pour la méthode à l'arginase) doit inciter à la plus grande prudence dans l'interprétation des résultats. La sensibilité des méthodes est de 2 % pour la méthode de Jansen,

5 à 10 % pour les méthodes de SAKGUCHI, de VAN SLYKE à la soude et de KAPELLER-ADLER.

Leur utilisation judicieuse permet de rechercher les différences importantes entre certains groupes de protéides, mais leur sensibilité est bien faible pour satisfaire les physiologistes. C'est à de nouvelles méthodes qu'il faudra s'adresser afin d'abaisser les erreurs à moins de 1 % et de mettre un instrument précis dans les mains de ceux qui observent les variations faibles, mais continuelles, de la matière vivante.

Vu : le Président de la thèse,
R. FABRE.

Vu : le Doyen,
PAUL GUÉRIN.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
S. CHARLÉTY.

BIBLIOGRAPHIE

53. Bechamp (A.). — Extrait d'une thèse sur les substances albuminoïdes et sur leur transformation en urée (*Ann. Ch. Phys.*, 1856 (3) ; **48**, 348).

55. Bechamp (A.). — Sur la formation de l'urée par l'action de l'hypermanganate de potasse sur les matières albuminoïdes (*C. R.*, 1870 ; **70**, 866).

59. Bechamp (A.). — Mémoire sur les matières albuminoïdes (Mémoires présentés par divers savants à l'Académie des Sciences, 1884 ; **28**, n° 3, p. 380).

62. Benech (E.) et Kutscher (F.). — Die Oxydations-produkte des Arginins (*Ztschhr. Physiol. Chem.*, 1901 ; **3**, 278).

85. Bergmann (M.), Ensslin (H.) et Zervas (L.). — Uber die Aldehyd. — Verbinddungen der Aminosäuren (*Ber.*, 1925 ; **58**, 1034).

86. Bergmann (M.) et Zervas (L.). — Uber die Aldehydverbindugen der Aminosäuren und ihre Präparative Verwendung (*Ztschr. Physiol. Chem.*, 1926 ; **152**, 282).

34. Block (R. J.). — The basic amino-acids of keratins. The basic amino-acid content of human finger noils and cattle horn (*J. biol. Chem.*, 1934 ; **104**, 339).

116 *bis*. Block (R. J.). — The basic amino acids of three mammalian hemoglobins (*J. of biol. Chem.*, 1934 ; **105**, 603).

36. Block (R. J.) et Vickery (H. B.). — A chemical relationship between various keratins (*J. biol. Chem.*, 1931 ; **93**, 113).

47. Brazier (M. A. B.). — A new method for the separation of the products of protein hydrolysis (*Biochem. J.*, 1930 ; **24**, 1188).

43. Buston (H. W.) et Schryver (S. B.). — A method for the separation of amino-acids from the products of hydrolysis of proteins and other sources. Preliminary communication (*Biochem. J.*, 1921 ; **15**, 638).

33. Cahn (Th.) et Bonot (A.). — Recherches sur les variations des équilibres des constituants cellulaires. IV. Techniques (*Ann. Physio. Physico. Ch. biol.*, 1928 ; **4**, 822).

110. Calvery (H. O.). — Basic amino-acids. The estimation of the basic amino-acids in small amounts of casein and edestin by the modified method of Vickery and Leavenworth and other methods (*J. biol. Chem.*, 1929 ; **83**, 631).

7. Chittenden (R. H.) et Eustis (A. C.). — The proportion of basic nitrogen yielded by elastin on decomposition with hydrochloric acid (*Ann. J. Physiol.*, 1900 ; **3**, XXXI).

117. Clark (W. M.). — The determination of hydrogen ions (717 p. Baltimore 1928, The Williams and Wilkins Company, Editeur).

52. Cohn (E. J.). — Die Bestimmung der Aminosäuren in der Eiweisskörporn. Bestimmung den Aminosäuren in bestimmten Proteinen (*Erg. der Physiol.*, 1932 ; **33**, 870).
49. Dakin (H. O.). — On amino-acids (*Biochem. J.*, 1918 ; **12**, 290).
50. Dakin (H. O.). — Amino-acids of gelatin (*J. biol. Chem.*, 1920 ; **44**, 499).
95. Dauphinee (J. A.) et Hunter (A.). — The rate of liberation of arginine in tryptic digestion (*Biochem. J.*, 1930 ; **24**, 1128).
18. Davies (W. C.). — The titration of protein hydrolysates (*Bioch. J.*, 1927 ; **21**, 815).
93. Eldbacher (S.) et Bonem (P.). — Beiträge zur Kenntnis der Arginase (*Ztschr. physiol. Chem.*, 1925 ; **145**, 69).
120. Engeland (R.). — Uber den Nachweiss organischer Basen im Harm (*Ztschr. physiol. Chem.*, 1908 ; **57**, 49).
124. Folin (O.) et Ciocalteu (V.). — On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. The preparation of pure mercuric sulphate (*J. biol. Chem.*, 1927 ; **73**, 648).
41. Foreman (F. W.). — Rapid volumetric methods for the estimation of amino-acids, organic acids and organic bases (*Bioch. J.*, 1920 **14**, 451).
89. Fosse (R.). — L'urée (303 p., Paris, 1928 ; Les Presses Universitaires de France).
70. Furth (O.) et Deutschberger (O.). — Uber den Argininghalt einiger Proteine sowie normaler und amyloihaltiger Organe (*Bioch. Ztschr.*, 1927 ; **186**, 139).
106. Furth (O.) et Majer (E. H.). — Uber das Auftreten von Imidazolderivaten im Harn (*Bioch. Ztschr.*, 1933 ; **264**, 142).
82. Gerngross (O.). — Die Fähigkeit der tierischen Haut zur Reaktion mit Phenolaldehyden (*Bioch. Ztschr.*, 1920 ; **108**, 82).
84. Gerngross (O.) et Zuhlke (E.). — Uber eine eifache Synthese von N-Benzyliden-aminosäure Salzen (*Ber.*, 1924 ; **57**, 1482).
14. Gortner (R. A.) et Hoffman (W. F.). — Evidence of a new amino-acid in proteins (*J. Am. Ch. Society* ; 1925 ; **47**, 580).
10. Gortner (R. A.) et Sandstrom (W. M.). — Prolin and tryptophan as factors influencing the accuracy of Van Slyke's method for the determination of nitrogen distribution in proteins (*J. Am. Ch. Society* ; 1925 ; **47**, 1663).
4. Gulewitsch (W.). — Uber das Arginin (*Ztschr. physiol. Chem.*, 1899 ; **27**, 178).
15. Hanke (M. T.) et Koessler (K. K.). — Studies on proteinogenous amines. VII. The quantitative colorimetric estimation of histidine in protein and protein containing matter (*J. biol. Chem.*, 1920 ; **43**, 527).
72. Harden (A.). — On Voges and Proskauer's reaction for certain bacteria (*Proceed. of the Royal Soc. of London B.*, 1905-1906 ; **77**, 424).
73. Harden (A.) et Norris (D.). — The diacetylreaction for proteins (*J. Physiol.*, 1911 ; **42**, 332).
3. Hausmann (W.). — Uber die Vertheilung des Stickstoffs im Eiweissmolekül (*Ztschr. physiol. Chem.*, 1899 ; **27**, 95).
121. Hopkins (F. G.) et Cole (S. W.). — A contribution to the Chemstry of

proteids. A preliminary study of a hitherto undescribed product of tryptic digestion (*J. Physiol.*, 1901 ; **27**, 418).

25. Hopkins (F. G.) et Savory (H.). — A study of Bence-Jones protein. and of the metabolism in three cases of Bence-Jones proteinuria, Chemistry of the protein (*J. Physiol.*, 1911 ; **42**, 217).

112. Hunter (G.). — Note on Knoop's test for histidine (*Bioch. J.*, 1922 ; **16**, 637).

107. Hunter (G.). — The diazoreaction in urine (*Biochem. J.*, 1925 ; **19**, 25).

35. Hunter (A.) et Borsook (A.). — The dissociation constants of arginine (*Bioch. J.*, 1924 ; **18**, 883).

94. Hunter (G.) et Dauphinee (J. A.). — The determination of arginine by the use of arginase (*J. biol. Chem.*, 1925 ; **63**, 39).

88. Iwanoff (N. N.). — Der Harnstoff der Pilze und dessen Bedeutung (*Ztschr. physiol. Chem.*, 1927 ; **170**, 274).

90. Jansen (B. C. P.). — Ein Verfahren zur genauen Quantitativen Arginin Bestimmung in Eiweissarten (*Chem. Weekbl*, 1917 ; **14**, 124).

69. Jean (Mlle G.). — Sur les microdosages colorimétriques de l'arginine en solution pure et dans les hydrolysats protéiques (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934 ; **16** ; 307).

105. Jorpes (E.). — The colorimetric estimation of histidine (*Biochem. J.*, 1932 ; **26**, 1507).

68. Jorpes (E.) et Thoren (S.). — The use of the Sakaguchi reaction for the quantitative determination of arginine (*Bioch. J.*, 1932 ; **26**, 1504).

114. Kapeller-Adler (R.). — Uber eine neue Methode zur quantitativen Histidinbestimmung und über der Anwendbarkeit zur Untersuchung von biologischen Flüssigkeiten, insberondere von graviden Harnen (*Bioch. Ztschr.*, 1933 ; **164**, 131).

19. Kernot (J. C.) et Knaggs (J.). — The estimation of the diaminonitrogen in the products of hydrolysis of proteins (*Bioch. J.*, 1928 ; **22**, 528).

31. Kiesel (A.). — Zur methodik der Fällung von Basen als Silberverbindungen (*Ztschr. physiol. Chem.*, 1926 ; **161**, 147).

44. Kingston (H. L.) et Schryver (S. B.). — Investigations on gelatin. Part. III. The separation of the products of hydrolysis of gelatin by carbamat method (*Bioch. J.*, 1924 ; **18**, 1070).

20. Knaggs (S.). — Some notes on the determination of the Hausmann numbers of proteins (*Bioch. J.*, 1923 ; **17**, 488).

100. Knecht (E.) et Hibbert (E.). — Das Titantrichlorid in der volumetrischen Analyse (*Ber.*, 1903 ; **36**, 11, 1549).

111. Knoop (F.). — Eine Farbenreaktion des Histidins (*Hofmeister's Beitr.*, 1908 ; **11**, 356).

96. Kober (P. A.) et Sugiura (K.). — The copper complexes of amino-acids, peptides and peptones (*J. biol. Chem.*, 1912-1913 ; **13**, 1).

97. Kober (P. A.) et Sugiura (K.). — A microchemical method for the determination of α-and β-amino-acids and certain derivates ; in proteolysis, blood and urine (*Am. J. Physiol.*, 1913 ; **35**, 1546).

104. Koessler (K. K.). et Hanke (M. T.). — Studies on proteinogenous amines. II. A microchemical colorimetric method for estimating imidazole derivative (*J. biol. Chem.*, 1919 ; **39**, 497).

57. Kolbe (H.). — Chemische ungebühr und unsitte (*J. Prakt. Chem.*, 1871 ; (N. F.) ; **4**, 399).

119. Kossel (A.). — Uber die basischen Stoffe des Zelkerns (*Zschr. physiol. Chem.*, 1896-1897 ; **22**, 176).

48. Kossel (A.). — Uber die Constitution der Einfachsten Eiweisstoffe (*Ztschr. physiol. Chem.*, 1898 ; **25**, 165).

91. Kossel (A.) et Dakin (H. O.). — Uber die Arginase (*Ztschr. physiol. Chem.*, 1904 ; **41**, 321).

26. Kossel (A.) et Eldbacher (S.). — Uber die Trennung von Arginin und Histidin (*Ztschr. physiol. Chem.*, 1920 ; **110**, 241).

9. Kossel (A.) et Kutscher (F.). — Beiträge zur Kenntniss der Eiweiskörper (*Ztschr. physiol. Chem.*, 1900 ; **31**, 166).

87. Kossel (A.) et Gross (R. E.). — Uber die Darstellung und quantitative Bestimmung des Arginins (*Ztschr. physiol. Chem.*, 1924 ; **135**, 167).

21. Kossel (A.) et Patten (A. J.). — Zur Analyse der Hexonbasen (*Ztschr. Physiol. Chem.*, 1903 ; **38**, 39).

22. Kossel (A.) et Pringle (H.). — Uber Protamine und Histone. III. Uber das Histon (*Ztschr. Physiol. Chem.*, 1906 ; **49**, 314).

115. Kossel (A.) et Staudt (H.). — Uber die quantitative Bestimmung von Arginin und Histidin (*Ztschr. physiol. Chem.*, 1926 ; **156**, 270).

5. Kutscher (Fr.). — Uber die Verwendung der Phosphorwolframsaüre bei quantitativen Bestimmungen der Spaltangsprodukte des Eiweiss (*Ztschr. physiol. Chem.*, 1900-1901 ; **31**, 215).

74. Lang (K.). — Uber den Mechanismus der Diacetylreaktion von Guanidinen here Umformung und Anwendung zur kolorimetrisch Bestimmung von Kreatin und Arginin (*Ztschr. physiol. Chem.*, 1932 ; **208**, 273).

99. Lautenschlager (C. L.). — Uber die titrimetrische Bestimmung des Histidins und anderer Imidazolderivate (*Ztschr. physiol. Chem.*, 1918 ; **102**, 226).

118. Leavenworth (C. S.). — On the basic amino-acids yielded by casein (*J. biol. Chem.*, 1924 ; **61**, 315).

113. Lieben (F.) et Muller (R.). — Uber die Bromaufnahme von Casein, sowie von Casein- und Keratinhydrolysaten (*Bioch. Ztschr.*, 1928 , **197** ; 119).

56. Loew (O.). — Uber die Oxydation der Albuminate zu Harnstoff (*J. Prakt. Chem.*, 1870 (N. F.) ; **2**, 289).

60. Lossen (E.). — Guanidine, ein Oxydationsprodukt des Eiweisses ; Beitrag zur Frage der Harnstoffbildung (*Liebigs Ann.*, 1880 ; **201**, 369).

92. Marshall (E. K.). — A rapid chimical method for the estimation of urea in urine (*J. biol. Chem.*, 1913 ; **14**, 283).

42. Mitchell et Hamilton. — The biochemstry of the amino-acids (619 p. New-York, 1929, Chemical Catalog Company éd.).

123. Onslow (H.). — On the stability of tryptophan in baryta hydrolysis (*Bioch. J.*, 1921 ; **15**, 383).

122. Onslow (H.). — On the nature of the substances precipitated by mercuric sulphate from hydrolysed caseinogen with reference to the estimation and isolation of tryptophan (*Bioch. J.*, 1921 ; **15**, 392).

98. Onslow (H.). — A method of estimating the tryptophan content of

caseinogen, based on determinations of the nitrogen values of the mercuric sulphate precipitate (*Bioch. J.*, 1924 ; **18**, 63).

65. Orglmeister (G.). — Uber die Bestimmung des Arginin mit Permanganat (*Hoffmeisters Beitr.*, 1906 ; **7**, 21).

11. Osborne (T. B.) et Harris (T. F.). — Nitrogen in protein bodies. *J. Am. Ch. Society*, 1903 ; **25**, 323).

24. Osborne (T. B.), Leavenworth (C. S.) et Brautlecht (C. A.). — The different forms of nitrogen in proteins (*Am. J. Physiol.*, 1908 ; **23**, 180).

51. Osborne (T. B.), Leavenworth (C. S.) et Nolan (L. S.). — A note, on Dakin's method as applied to edestin (*J. biol. Chem.*, 1924 ; **61**, 309).

64. Otori (S.). — Die Oxydation des Pseudomucins und Caseins mit Calcium-permanganat (*Ztschr. physiol. Chem.*, 1904-1905 ; **43**, 86).

101. Pauly (H.). — Uber die Constitution des Histidins (*Ztschr. physiol. Chem.*, 1904 ; **42**, 508).

102. Pauly (H.). — Uber die Einwirkung von Diazoniumverbindungen auf Imidazole. — Erwiderung en Herrn Burrian (*Ztschr. physiol. Chem.*, 1905 ; **44**, 159).

76. Plimmer (R. H. A.). — The analysis of proteins. I. The estimation of arginine by decomposition with alcali (*Biochem. J.*, 1916 ; **10**, 115).

39. Plimmer (R. H. A.). — The analysis of proteins. II. The action of nitrous acid upon the hexon bases (*Biochem. J.*, 1924 ; **18**, 105).

108. Plimmer (R. H. A.) et Eaves (E. C.). — The estimation of tyrosine by bromination (*Biochem. J.*, 1913 ; **7**, 297).

109. Plimmer (R. H. A.) et Philips. — The analysis of proteins. III. Estimation of histidine and tyrosine by bromination (*Biochem. J.*, 1924 ; **18**, 312).

17. Plimmer (R. H. A.) et Rosedale (J. L.). — Analysis of proteins. VII. Direct estimation of arginine (*Biochem. J.*, 1925 ; **19**, 1020).

16. Plimmer (R. H. A.) et Rosedale (J. L.). — Analysis of proteins. (V) Van Slyke's method of determination of nitrogen distribution (*Biochem. J.*, 1925 ; **19**, 1004).

71. Poller (K.). — Uber die Farbenreaktion von Sakaguchi (*Bioch. Ztschr.*, 1927 ; **59**, 1226).

61. Pommerenig (E.). — Uber Guanidinzeseztung im Tierkörper (*Hoffmeisteris Beitr.*, 1901-1902 ; **1**, 561).

58. Ritter (E.). — Sur la transformation des matières albuminoïdes en urée (*Bull. Soc. Chim.*, 1971 ; (2) ; **16**, 32).

2. Roche (J.), Duboulez (P.) et Jean (Mlle G.). — Recherches sur les globines. III. Sur la spécificité du constituant protéique des globines (*Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1934 ; **16**, 757).

32. Rosedale (J. L.). — The amino-acids of flesh. III. The diaminoacids content of fish (*Bioch. J.*, 1929 ; **23**, 161).

66. Sakaguchi Shoyo. — Arginine free protein (*J. bioch. Japan* ; 1925 ; **5**, 143).

83. Scheibler (H.) et Baumgarten (P.). — Uber eine Synthese von N-Alkyliden-aminosäuren und ihrer Uberführung in N-Alkylaminosäuren durch Hydrierung (*Ber.*, 1922 ; **55**, 1358).

77. Schiff (H.). — Uber Alkylensubstituierte-amidosäuren (*Liebig's Annal.*, 1881 ; **210**, 114).

78. Schiff (H.). — Uber Methylenasparagine (*Liebig's Annal.*, 1899-1900 ; **310**, 25).

79. Schiff (H.). — Trennung von Amin- und Säurefunction in Lösungen von Aminosäuren mittelst Formaldehyd (*Liebig's Annal.*, 1901 ; **319**, 59).

80. Schiff (H.). — Trennung von Amin und Säurefunction in Lösungen von Eiweisskörpern (*Liebig's Annal.*, 1901 ; **319**, 287).

81. Schiff (H.). — Trennung von Amin und Säurefunction mittelst Formaldehyd (*Liebig's Annal.*, 1902 ; **325**, 348).

45. Schryver (S. B.) et Buston (H. W.). — The isolation of some hitherto undescribed products of hydrolysis of proteins. Part. II (*Proceed. of the Royal Soc. of London*, B. 1926 ; **99**, 476).

75. Schul ze (E.) et Likiernick. — Uber die Bildung von Harnstoff bei der Spaltung des Arginins (*Ber.*, 1891 ; **24**, 2701).

8. Schultze (E.) et Winterstein (E.). — Uber das Verhalten einiger Monoaminsäuren gegen Phosphorwolframsaüre (*Ztschr. physiol. Chem.*, 1901 ; **33**, 574).

40. Sekine (H.). — Reaction of nitrous acid upon arginine and formule for calculation of histidine (*Nogakukahio* ; Tokio, 1919, **1**, 197) ; d'après *Chem. Abstract.*, 1921 ; **15**, 243).

54. Stadeler (G.). — Kleinerer Mittheilungen (*J. Prakt. Chem.*, 1857 ; **72**, 250).

1. Thomas (P.). — Cours de Chimie Biologique. I. Partie générale, 362 p., 1926, Paris. Les Presses Universitaires de France, éditeur.

46. Town (B. W.). — The isolation of pure 1-Prolin (*Biochem. J.*, 1928 ; **22**, 1083).

37. Van Slyke (D. D.). — A method for quantitative determination of aliphatic aminogroups (*J. biol. Chem.*, 1911 ; **9**, 185).

12. Van Slyke (D. D.). — The analysis of proteins by determination of the chemical group characteristic of the different amino-acids (*J. biol. Chem.*, 1911-1912 ; **10**, 15).

38. Van Slyke (D. D.). — The quantitative determination of aliphatic amino-groups (*J. biol. Chem.*, 1912 ; **12**, 275).

13. Van Slyke (D. D.). — Improvements in the method for analysis of proteins by determination of the chemical group characteristic of the different amino-acids (*J. biol. Chem.*, 1915 ; **22**, 281).

116. Vickery (H. B.). — A useful compound of histidine (*J. biol. Chem.*, 192, **71**, 303).

27. Vickery (H. B.) and Leavenworth (C. S.). — On the separation of arginine and histidine (*J. biol. Chem.*, 1926 ; **68**, 225).

28. Vickery (H. B.) et Leavenworth (C. S.). — On the separation of histidine and arginine. II. The separation of the silber compounds at pH = 7,0 (*J. biol. Chem.*, 1927 ; **72**, 403).

30. Vickery (H. B.) et Leavenworth (C. S.). — Modifications for the determination of the basic amino-acids of proteins. The bases of edestin (*J. biol. Chem.*, 1928 ; **76**, 707).

29. Vickery (H. B.) et Leavenworth (C. S.). — The basic amino-acids of horse hemoglobine (*J. biol. Chem.*, 1928 ; **79**, 377).

67. Weber (C. J.). — A modification of Sakaguchi's reaction for the quantitative determination of arginine (*J. biol. Chem.*, 1930 ; **86**, 217).

23. Weiss (F.). — Untersuchungen über die Bildung des Lachsprotamins (*Ztschr. physiol. Chem.*, 1907 ; **52**, 107).

103. Weiss (M.) et Ssobolew (N.). — Uber ein colorimetrisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Histidins (*Bioch. Ztschr.*, 1913-1914 ; **58**, 119).

6. Wetzel (G.). — Die organischen Substanzen des Schallen von Mytilus und Pinna (*Ztschr. physiol. Chem.*, 1900 ; **29**, 386).

63. Zickgraf (G.). — Die Oxydation des Leims mit Permanganaten (*Ztschr. physiol. Chem.*, 1904 ; **41**, 253).

981. — Impr. de la Fac. de Méd., Jouve et Cie, 15, rue Racine, Paris. — 12-34